

Isotopenstudien über die Kohlendioxydfixierung bei heterotrophen Mikroorganismen

München 1964

von
Klaus Grabbe

November 1963



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548301_0012

Isotopenstudien über die Kohlendioxydfixierung
bei heterotrophen Mikroorganismen.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig - Maximilians - Universität
zu München.

vorgelegt
von
Klaus Grabbe
aus
Fuhlen/Niedersachsen.

November 1963



1. Referent : Prof. Dr. O. Kandler.

2. Referent : Prof. Dr. L. Brauner.

Tag der mündlichen Prüfung: 22.1.1964

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
A. <u>Einleitung</u>	1
B. <u>Methodik</u>	16
I. Material	16
II. Versuchsanordnung	18
III. Aufarbeitung der flüchtigen, der nicht-flüchtigen, löslichen und der unlöslichen Fraktionen	18
IV. Trennung und Identifizierung der radioaktiv markierten Produkte	22
1. Chromatographie	22
2. Cochromatographie	24
3. Identifizierung phosphorylierter Verbindungen	25
4. Abbau radioaktiv markierter Verbindungen	28
5. Messung der Radioaktivität und Auswertung der Meßdaten	30
C. <u>Versuchsergebnisse</u>	32
I. <u>Bakterien</u>	32
1. Organismen mit überwiegender Fixierung des $C^{14}O_2$ in Asparaginsäure als Folgeprodukt der primär gebildeten Oxalelessigsäure. Geringe Verteilung der Radioaktivität in Sekundärprodukte.	
a. Milchsäurebakterien.	
a_1 . $C^{14}O_2$ -Fixierung während des Wachstums	32
<u>Organismen:</u> Lactobacillus bulgaricus.	
" plantarum.	
Streptococcus diacetylactis.	
Leuconostoc mesenteroides.	

- a₂. C¹⁴O₂-Fixierung und Verteilung markierter Produkte
in Abhängigkeit von der Zeit und dem Substrat bei
gewaschenen Zellen 34

Organismen:

- a_{2,1}. Lactobacillus plantarum 34
" casei.
" bulgaricus l.
" bulgaricus B₂.
Pediococcus cerevisiae.
a_{2,2}. Streptococcus lactis 37
Streptococcus diacetylactis.
b. Staphylococcus aureus 40

2. Organismen mit überwiegender Fixierung des C¹⁴O₂ in
Asparagin- und Zitronensäure als Folgeprodukte der
primär gebildeten Oxalessigsäure. Ausgeprägte Ver-
teilung der Radioaktivität in Sekundärprodukte 43

Organismen:

Pseudomonas pyocyanea.
Sarcina flava.
Micrococcus lysodeikticus.
Flavobacterium spec.

3. Organismen mit Fixierung des C¹⁴O₂ in Äpfel- und
Asparaginsäure als Primär- und Folgeprodukte ver-
schiedener Fixierungsmechanismen der C₃+C₁-Addition . 61

Organismen:

- a. Corynebacterium nephridii..... 61
Nocardia flava.
Streptomyces griseus.
Arthrobacter suboxydans.
Bacillus coagulans.
b. Propionibacterium freudenreichii 72

4. Organismen mit überwiegender Fixierung des $C^{14}O_2$ in Äpfelsäure als Primärprodukt der Malic-Enzym-Reaktion	76
--	----

Organismen:

Aerobacter aerogenes.
Serratia marcescenz.
Escherichia coli.

5. Organismen mit Fixierung des $C^{14}O_2$ in Asparaginsäure, Äpfel- und Bernsteinsäure als Produkte verschiedener Fixierungsmechanismen	91
---	----

Organismen:

Mycobacterium phlei.
Nocardia rubra.

II. <u>Hefen</u>	101
Rhodotorula glutinis	101
Candida crusei	103
Candida spec.	103
Saccharomyces carlsbergensis	108

III. <u>Pilze</u>	111
Fusarium discolor	111
Rhizopus oryzae	116
Absidia glauca	118
Mucor mucedo	123
Pyronema confluens	125
Aspergillus flavus	129
Oospora lactis	132
Chaetomium spec.	133

D. <u>Schlußbetrachtung</u>	140
E. <u>Zusammenfassung</u>	144
F. <u>Literaturverzeichnis</u>	146

A. Einleitung.

Zu Beginn dieses Jahrhunderts gaben die Unstimmigkeiten in den Gärungsbilanzen heterotropher Organismen Anlaß zu den verschiedensten Theorien, die alle auf der vermeintlichen Tatsache beruhten, daß sowohl Carbonat als auch Kohlendioxyd bei Stoffwechselvorgängen als inert zu betrachten seien. Um den Mangel an C_1 -Bruchstücken zu erklären, postulierten Virtanen (1) und Kluyver (2) eine C_4+C_2 -Spaltung der Glucose im Gärungsverlauf bei *Escherichia coli*. Ähnliche Überlegungen führten bei Versuchen über die Citratbildung bei Pilzen zur Annahme einer Acetatcondensation (3).

Der russische Physiologe A.F. Lebedev (4) erörterte dagegen schon 1921 in seiner Arbeit über den Gärungsstoffwechsel bei *Aspergillus niger* die Möglichkeit einer Kohlendioxydfixierung. Daß das Wachstum vieler Mikroorganismen von der Anwesenheit des Kohlendioxyds abhängig ist, wurde bereits in den zwanziger Jahren mehrfach beschrieben. So prüften z.B. Rippel und Heilmann 1930 (5) das Wachstum von *Botrytis cinerea* in Abhängigkeit vom Kohlendioxydgehalt der Luft und fanden bei 1,2 % maximales Wachstum. Golding 1940 (6) erhielt dagegen bei drei Stämmen von *Penicillium roquefortii* eine Wachstumsförderung bis zu einem CO_2 -Gehalt von 30 %, wenn die Organismen bei Zimmertemperatur kultiviert wurden. Die Abwesenheit von CO_2 machte sich in den Experimenten von Hes 1938 (7) mit *Aspergillus niger* als Objekt dadurch bemerkbar, daß die Reduktion von Methylenblau stark gehemmt wurde, was auf eine Blockierung des Atmungsstoffwechsels schließen ließ.

Von entscheidender Bedeutung waren allerdings erst die Untersuchungen von Wood und Werkman (8) in den dreißiger Jahren, die bei der Propionsäuregärung eine CO_2 -Fixierung nachweisen konnten. Die von ihnen formulierte und später als Wood-Werkman-Reaktion bezeichnete Carboxylierung der Brenztraubensäure entsprach zwar nicht dem tatsächlichen Reaktionsverlauf, doch wurde sie in späteren Jahren durch die Entdeckungen einer Vielzahl von Reaktionen, die zu einer C_3+C_1 -Addition führen, formal immer wieder bestätigt.



Neben der kohlendioxydabhängigen Bildung der wichtigen C_4 -Körper wurden eine Reihe weiterer Stoffumsetzungen gefunden, die eine CO_2 -Fixierung erfordern. Es erscheint daher angebracht, nachfolgend

einen kurzen Überblick über die bis heute bekannten Carboxylierungsreaktionen zu geben. In diesem Zusammenhang sei besonders auf die Sammelreferate von Calvin und Pon 1959 (9), sowie von Wood und Stjernholm 1962 (10) verwiesen.

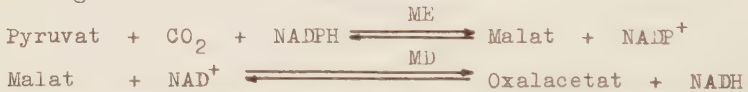
I. CO₂-Fixierung über typische Carboxylierungsreaktionen.

A. Carboxylierungsreaktionen, die reduzierte Nicotinamid-adenin-dinucleotide als Energiequelle erfordern.

1. Malic-Enzym.

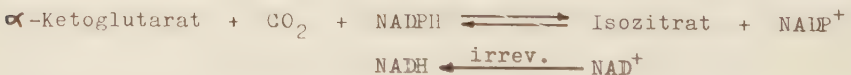


Ochoa (11) isolierte aus Taubenleber dieses Ferment, das in Gegenwart von NADP⁺ Äpfelsäure in Brenztraubensäure und Kohlendioxyd spaltet, wobei das Coferment hydriert wird. Die Reaktion ist reversibel, hängt von der Gegenwart von Mn⁺⁺-Ionen ab und verläuft nicht über freie Oxalessigsäure als Zwischenprodukt. Diese kann vielmehr in einer zweiten enzymatischen Reaktion aus Äpfelsäure durch NAD-abhängige Malat-Dehydrogenase (MD) gebildet werden. Die Wood-Werkman-Reaktion stellt also hier die Bilanz zweier enzymatischer Reaktionen dar, die wie folgt zu formulieren sind:



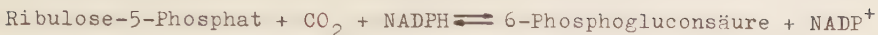
Das "malic-enzyme" (ME) wurde in tierischem und pflanzlichem Gewebe bereits verschiedentlich nachgewiesen (10), doch bedarf es bei den heterotrophen Mikroorganismen noch der endgültigen Bestätigung.

2. Isozitronensäure-Dehydrogenase (12).



Von einer CO₂-Fixierung auf diesem Wege bei Bakterien oder Pilzen wurde bisher nicht berichtet, doch besteht die Wahrscheinlichkeit ihres Vorhandenseins.

3. Phosphogluconsäure-Dehydrogenase.



Horecker und Smyrniotis (13) zeigten als erste anhand des aus Hefe isolierten und gereinigten Enzyms, daß die Reaktion reversibel ist und zur CO_2 -Fixierung theoretisch in Frage kommen könnte. Phosphogluconsäure-Dehydrogenase wurde bei vielen Bakterien (10), in Hefe (13) und in Pflanzen (15) gefunden. Der Einbau von CO_2 auf diesem Wege wird bisher allein von Moses et al. (16) bei *Zygorrhynchus moelleri* beschrieben.

B. Carboxylierungsreaktionen, die Adenosintriphosphat als Energiequelle erfordern.

1. Propionyl-Carboxylase.



Im Jahre 1955 erhielten Flavin et al. (17) eine CO_2 -Fixierung, die der obigen Beziehung entspricht. Beck et al. (18), Beck und Ochoa (19) und Lengyel et al. (20) konnten die Umwandlung des Methylmalonyl-CoA in Succinyl-CoA durch Methylmalonyl-Isomerase ermitteln. Obwohl bisher nur in zellfreien Extrakten von *Rhodospirillum rubrum* eine CO_2 -Fixierung in Gegenwart von Propionyl-CoA, Mg^{++} und ATP nachgewiesen wurde (Knight und Gibson (21)), könnte diese Reaktion auch für andere Organismen von Bedeutung sein.

2. β -Methylcrotonyl-Carboxylase.

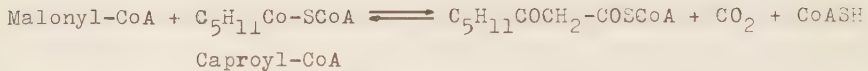


Diese Carboxylierungsreaktion spielt im Mechanismus des Leucinabbaues eine wichtige Rolle, wie Arbeiten von Coon et al. (23), Bachhawat et al. (22), Lynen und Knappe (24) zeigen konnten. Obiges Enzym wurde aus *Mycobakterium spec.*, aus Küken- und Rinderleber isoliert und kürzlich von Rilling und Coon (25) auch in *Pseudomonas oleovorans* gefunden.

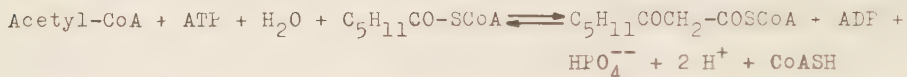
3. Acetyl-Carboxylase.



z.B.

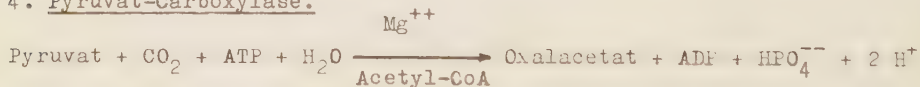


Bilanz:



Der Aufbau der Fettsäuren verläuft intermediär über Malonyl-CoA als Schlüsselreaktion und stellt in der Bilanz Kondensationen der C_2 -Einheiten des Acetyl-CoA dar. Das Kohlendioxyd hat gemäß obiger Formulierung lediglich die Funktion eines Katalysators. Zu diesen Ergebnissen kamen bei ihren Untersuchungen die Arbeitskreise um Brady, Gibson, Wakil und Lynen (10). Arbeiten von Stern (26) und Lane (27) geben zu der Vermutung Anlaß, daß es sich bei der Acetyl-Carboxylase, der Butyryl- und Propionyl-Carboxylase um ein identisches Enzymsystem handeln könnte.

4. Pyruvat-Carboxylase.



Diese Reaktion wurde von Utter und Keech (28) in Lebermitochondrien nachgewiesen. Seubert und Remberger (29) reinigten und beschrieben eine Pyruvat-Carboxylase bei *Pseudomonas citronellolis*.

5. Carbamylphosphat-Synthetase.



Im Jahre 1955 gelang es Jones et al. (30) mit einer zellfreien Präparation von *Streptococcus faecalis* Carbamylphosphat aus Ammoniumcarbonat und ATP zu synthetisieren. Die Verlagerung des Gleichgewichtes auf die Seite des Syntheseproduktes gelingt nur bei einer kontinuierlichen Regeneration des verbrauchten ATP. Aus Säugetierleber wurde dann später ein Enzymsystem isoliert, das im Gegensatz zu

obigen Befunden zur Bildung des Carbamylphosphates zwei Mol ATP und als Cofaktor Acetyl-l-Glutaminsäure benötigt. Arbeiten von Jones und Spector (31) deuten darauf hin, daß ein aktiver CO_2 -Acetylglutaminsäure-Komplex gebildet wird:



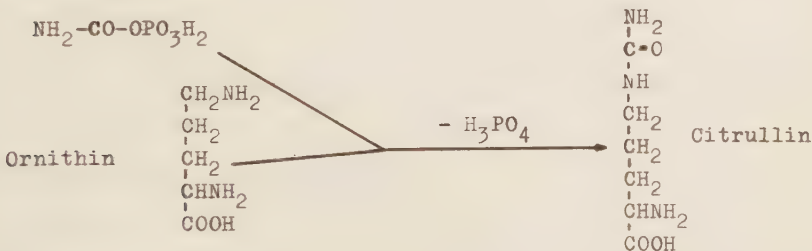
Der Reaktionsverlauf ergibt sich wie folgt:



Die ATP-abhängige Bildung des Carbamylphosphates ist sowohl mit der Synthese des Citrullins als auch mit der des Pyrimidinringes eng verknüpft und kann in diesem Zusammenhang als eine primäre Fixierungsreaktion gewertet werden, führt sie doch definitionsgemäß zu einer C-C-Bindung und damit zu einem Nettogewinn von Kohlenstoff.

a. Ornithintranscarbamylase.

Carbamylphosphat

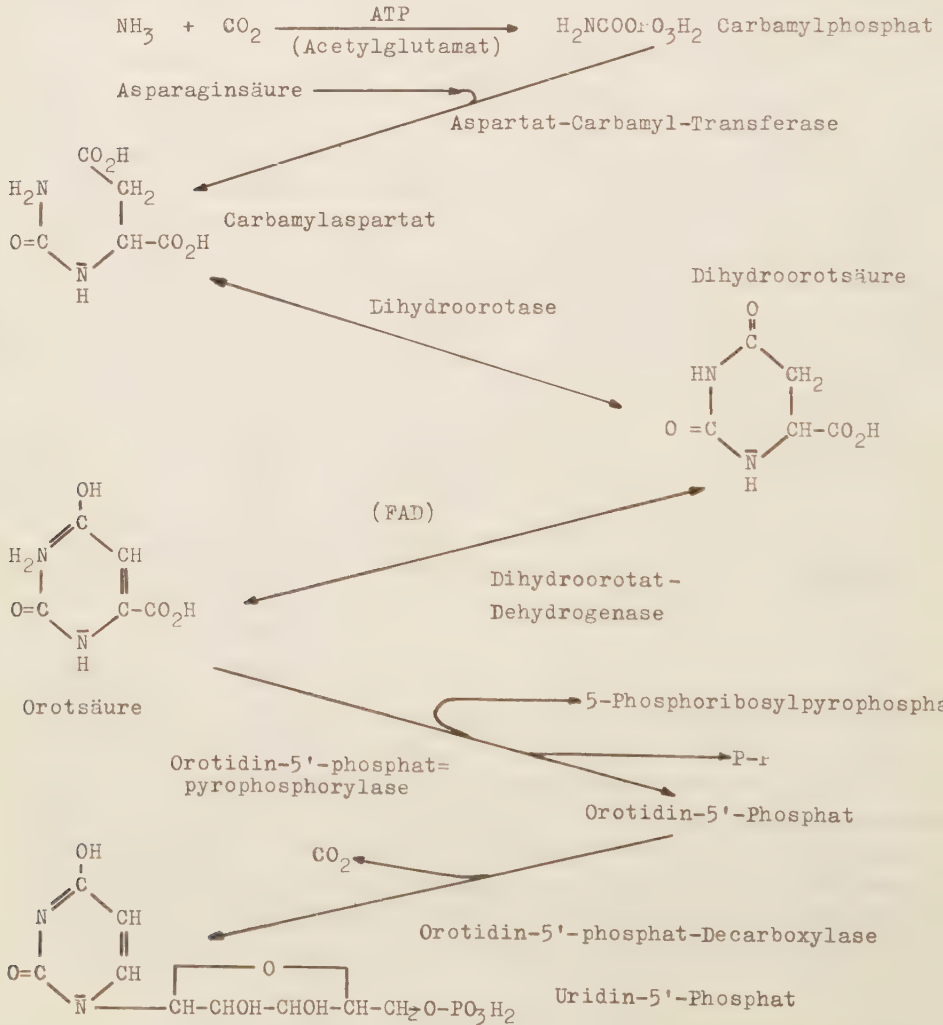


Die Übertragung der Carbamylgruppe auf das Ornithin unter Bildung des Citrullins wird im Lebergewebe wie auch in Bakterien vom gleichen Enzym katalysiert. Es wurde bei *Escherichia coli* genauer untersucht (32). Die Reaktion ist eine Teilstufe des von Krebs und Henseleit (33) aufgeklärten Ornithinzyklus, der in tierischem Leber- und Nierengewebe zur Eliminierung überschüssigen Stickstoffs in Form von Harnstoff dient. Welche Bedeutung ihm bei Mikroorganismen zukommt, bedarf noch der Klärung. Da Arginin ein wichtiger Proteinbaustein

ist, dürfte zumindest eine weite Verbreitung der Synthese des Citrul-
lins und des Arginins wahrscheinlich sein.

b. Aspartat-Carbamyl-Transferase.

Sheperdson und Pardee (34) stellten dieses Enzym hochgereinigt aus
Escherichia coli dar. Entdeckt wurde es zusammen mit der Dihydrooro-
tase und der Dihydroorotat-Dehydrogenase von Liebermann und Kornberg
(35) in Zymobacterium oroticum und Corynebakterien. Die Synthese der
Pyrimidinnucleotide ist heute in allen enzymatischen Schritten be-
kannt und gestaltet sich wie folgt:



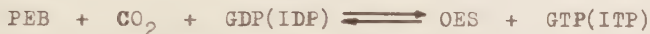
C. Carboxylierungsreaktionen, die keine zusätzliche Energiequelle benötigen.

1. Phosphoenolpyruvat-Carboxylase.



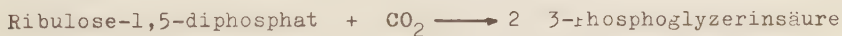
Das Enzym wurde von Bandurski und Greiner (36) in Spinatblättern entdeckt. Es katalysiert in einer irreversiblen Reaktion die Bildung der Oxalessigsäure. Andere Arbeiten bestätigen sein Vorhandensein in Pflanzen und Weizenkeimlingen (10). Bei Mikroorganismen findet es sich im autotrophen *Thiobacillus thioxydans* (37).

2. Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase.



Utter und Kurahashi (38) entdeckten dieses Enzym in Vogelleber und bestätigten damit die Beobachtungen von Evans et al. 1943 (39), daß ein Extrakt aus acetongetrockneter Schweineleber beträchtliche Mengen CO_2 fixiert. Utter (40) konnte den Beweis erbringen, daß zwei Carboxylierungsreaktionen vorliegen. Das Malic-Enzym katalysiert in Gegenwart von NADP^+ den CO_2 -Einbau in Äpfelsäure, und die Carboxykinase bildet unter Beteiligung von ALP Oxalessigsäure. In späteren Arbeiten wurde festgestellt, daß bei der obigen Reaktion nicht die Adenosin-nucleotide unmittelbar beteiligt sind, sondern das IDP bzw. ITP (41) und das GDP bzw. GTP (42). Sie stehen mit dem ATP-ADP-System über eine Nucleotiddiphosphokinase im Gleichgewicht. Die Carboxykinase ist in Weizenkeimlingen, in *Thiobacillus thiooxydans* und *Pseudomonas oxalaticus* aktiv (10).

3. Ribulosediphosphat-Carboxylase.

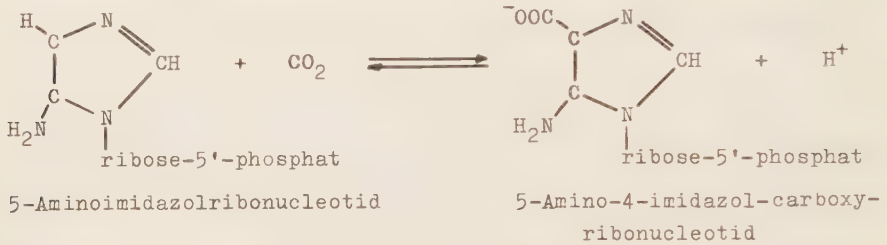


Dieses Enzym katalysiert die CO_2 -Assimilation bei photo- und chemosynthetischen Organismen. Quayle und Keech (43,44) wiesen ferner es in *Pseudomonas oxalaticus* nach.

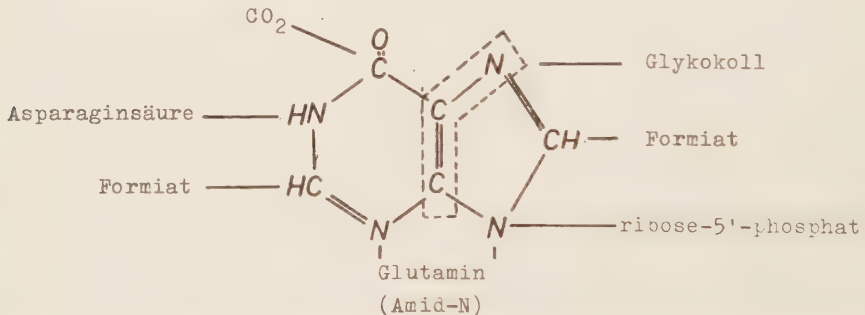
4. Aminoimidazolribonucleotid-Carboxylase.

Lukens und Buchanan (45) reinigten dieses Enzym aus Kükenleber. Bei Mikroorganismen oder Pflanzen wurde es bisher nicht untersucht. Seine weite Verbreitung dürfte allerdings außer Zweifel stehen,

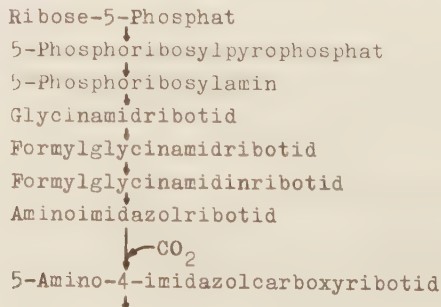
katalysiert es doch eine Carboxylierungsreaktion, die ein wichtiges Glied bei der Bildung des Purinringes darstellt.



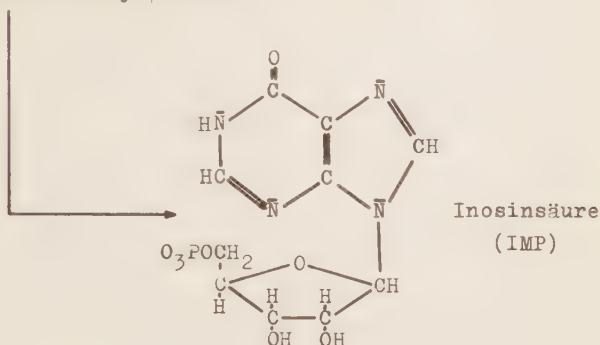
Die Herkunft der Bausteine des Puringerüstes war bereits in den Jahren 1946-1956 durch die Verwendung markierter Verbindungen geklärt worden (46).



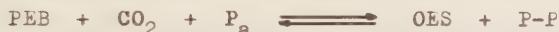
In einer Reihe von Untersuchungen an Mikroorganismen, vornehmlich *Escherichia coli*, und Leberhomogenaten des Meerschweinchens und der Taube wurde die Synthese der Purinnucleotide in ihren einzelnen Schritten aufgeklärt (46). Das nachstehende Schema sei als kurzer Überblick gedacht:



5-Amino-4-imidazol-N-succino-carboxyamidribotid
 5-Amino-4-imidazol-carboxyamidribotid
 5-Formamido-4-imidazolcarboxyamidribotid



5. Phosphoenolpyruvat-Carboxytransphosphorylase.



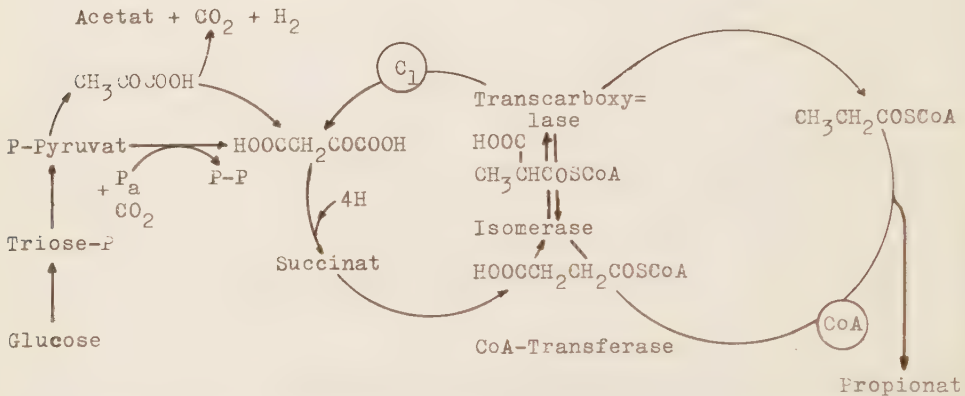
Laut Angaben von Siu et al. (47) besitzen Propionibakterien diese reversible Reaktion, die durch Zugabe von Pyrophosphatase zugunsten der Oxallessigsäure gefördert werden kann. Dieser Befund ist recht bemerkenswert, da Swick und Wood (48) bei Arbeiten über den Mechanismus der Propionsäuregärung bereits einen neuen Typ einer Carboxylierungsreaktion nachweisen konnten.

Methylmalonyl-Oxallessigsäure-Transcarboxylase.

Die Reaktion ist dadurch gekennzeichnet, daß die β -Carboxylgruppe der Oxallessigsäure nicht unmittelbar mit dem Kohlendioxyd im Gleichgewicht steht, wie es bei einer reversiblen Pyruvatcarboxylierung zu erwarten wäre. Vielmehr wird vom Methylmalonyl-CoA, das als Carboxydonator fungiert, im Verlauf einer zyklischen Reaktion ein C_1 -Körper auf das Pyruvat unter Bildung der Oxallessigsäure übertragen.

Die beiden geschilderten Carboxylierungsreaktionen runden das Bild der Propionsäuregärung ab. Radioaktives C^{14}O_2 wird über die Phosphoenolpyruvat-Carboxytransphosphorylase unter Bildung der Oxallessigsäure in den umseitig aufgezeichneten Zyklus eingeschleust, der sonst ähnlich dem Zitronensäurezyklus bei Entnahme von Oxallessigsäure für Synthesezwecke stehen bleiben würde. Die ursprünglich mit der Wood-Werkman-Reaktion erklärte Carboxylierung der Brenztraubensäure

erwies sich als eine C_4 -Synthese über eine Transcarboxylase-Reaktion, die nur im Prinzip der damals vermuteten C_3+C_1 -Addition entspricht.

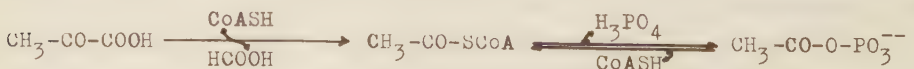


II. $C^{14}O_2$ -Fixierung über eine Umkehrung der α -Decarboxylierung.

1. Reversible Reaktionsschritte der "phosphoroclastischen" Pyruvat-spaltung.

Koepsell und Johnson, 1942, (49) beschrieben den Typ der phosphorolytischen Spaltung der Brenztraubensäure zu Essigsäure, Wasserstoff und CO_2 bei *Clostridium butylicum*, und Wilson wies 1948 (50) nach, daß das agierende Enzym gleichzeitig den Austausch von CO_2 mit der Carboxylgruppe des Pyruvats katalysiert. Ein Einbau markierten Formiats wurde nicht beobachtet. Dies war insofern interessant, als Utter et al. (51) bereits Jahre zuvor entdeckt hatten, daß ein lösliches Enzymsystem aus *Escherichia coli* den schnellen Austausch von Formiat mit der Carboxylgruppe der Brenztraubensäure bewerkstelligte.

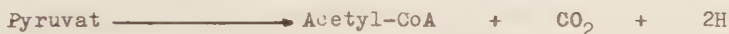
An diese ersten Arbeiten knüpften zahlreiche Untersuchungen an, um den Mechanismus der Acetatbildung aufzuklären. Lange Zeit diskutierte man als einleitenden Schritt eine phosphoroclastische Spaltung des Pyruvats, bis Mortlock et al. (52) mit einem Enzym aus *Clostridium butyricum* zeigen konnte, daß die Bildung des Acetyl-CoA auch in Abwesenheit von Orthophosphat erfolgt. Sie formulierten die nachstehende Reaktion:



Die Formel wird den komplizierten Reaktionsschritten, die zur Abspaltung der Carboxylgruppe und zur Bildung des Acetyl-CoA führen, nur ungenügend gerecht. Die Verwendung von Acetyl-C¹⁴₁-CoA bewirkte nämlich im Vergleich zur Austauschrate des C¹⁴O₂ bei *C. butyricum* oder des C¹⁴-Formiats bei *Escherichia coli* nur eine sehr geringe Markierung des Pyruvats. Sehr niedrig war der Austausch mit markiertem Acetat (51,50) und Acetyl-1-C¹⁴-phosphat (53).

Strecker (54) konnte als Cofaktoren des kompletten Enzymsystems bei *Escherichia coli* Thiaminpyrophosphat, Coenzym A, Orthophosphat und möglicherweise Mn⁺⁺-Ionen ermitteln. Wolfe und O'Kane erhielten ähnliche Ergebnisse (55), als sie das Cofaktorenbedürfnis bei *C. butyricum* im Zusammenhang mit der CO₂-Austauschreaktion studierten. Interessant war, daß sich die Gesamtreaktion im Unterschied zu *E. coli* durch Eisenionen stimulieren ließ. Dieser Befund fand seine nachdrückliche Bestätigung mit der Entdeckung des Ferredoxins beim gleichen Organismus durch Valentine et al. (56).

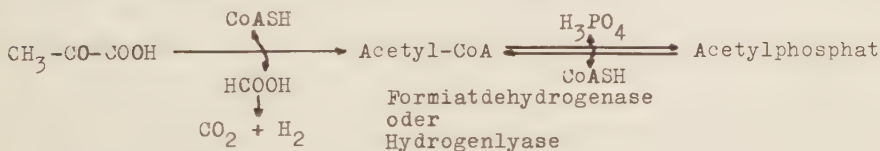
Die bis heute vorliegenden Ergebnisse lassen erkennen, daß die Decarboxylierung der Brenztraubensäure bei *E. coli* und *C. butyricum* durch verschiedene enzymatische Reaktionen bewirkt wird, wobei offensichtlich der intensive Austausch zwischen der Pyruvatcarboxylgruppe und dem Formiat bzw. CO₂ noch möglich ist, während nach Bildung des Acetyl-CoA die Gesamtreaktion



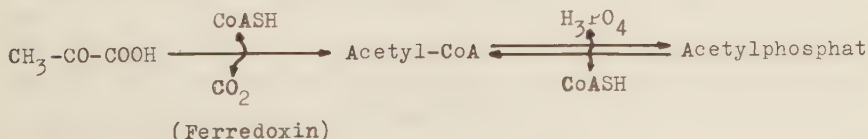
nur mehr eine unbedeutende Reversibilität aufweist.

Die Reaktion wäre also für die beiden Organismen wie folgt zu formulieren:

Escherichia coli:



Clostridium butyricum:



Die beiden Reaktionen unterscheiden sich durch die verschiedenen Wasserstoffacceptoren. Bei *Escherichia coli* erfolgt eine reversible Abspaltung der Carboxylgruppe als Ameisensäure und anschließend eine irreversible Oxydation dieser C_1 -Verbindung zu CO_2 und H_2 über die Formiatdehydrogenase oder die Hydrogenlyase. Es ist also verständlich, daß zwar Formiat nicht aber CO_2 mit der Carboxylgruppe des Pyruvats austauscht.

Bei *Clostridium butyricum* wird dagegen unmittelbar CO_2 abgespalten, das mit der Carboxylgruppe der Brenztraubensäure im Gleichgewicht steht. In diese Reaktion läßt sich zwar $C^{14}O_2$, jedoch kein C^{14} -Formiat einschleusen. Bei der Oxydation des nicht frei auftretenden Acetaldehyds zu Acetyl-CoA übernimmt das Ferredoxin den Elektronentransport.

2. Einbau von CO_2 über die reversible α -Decarboxylierung der α -Ketoglutarat- und der Pyruvatoxydase.

Die oxydative Decarboxylierung der α -Ketoglutar Säure zu Bernsteinsäure wurde bisher immer als der einzige irreversible Schritt des Zitronensäurezyklus angesehen, doch glauben Cantino et al. (58) auf Grund ihrer Ergebnisse, daß bei *Blastocladiella emersonii* unter bestimmten Voraussetzungen eine Umkehr im Verlauf einer zyklischen Reaktion möglich sei. Goldberg und Sanadi (59) beobachteten einen allerdings unbedeutenden Einbau von $C^{14}O_2$ in α -Ketoglutar Säure über die α -Ketoglutaratoxydase bei *Escherichia coli*. In Gegenwart der Pyruvatoxydase fand ein geringer Austausch zwischen der Pyruvatcarboxylgruppe und dem $C^{14}O_2$ statt. Nutting und Carson (60) ließen *Escherichia coli* Xylose vergären und setzten zusätzlich als Substrat $C^{14}H_3COONa$ und $C^{13}O_2$ ein. Sie stellten einen Einbau von C^{13} -Kohlenstoff in die Carboxylgruppe der Milchsäure fest. Dieses Ergebnis hatte zu der damaligen Zeit große Bedeutung, da man eine Spaltung der Xylose in eine Triose und einen C_2 -Körper annahm und bis dahin keine Erklärung für die hohe Ausbeute von 1,3 - 1,4 Mol Milchsäure pro Mol vergorener Pentose hatte. Heute ist bekannt, daß *E. coli* über die Transketolase-Transaldolase-Reaktion zuerst Fructose-6-Phosphat bildet, das dann in zwei Triosen umgewandelt wird. Unter diesem Aspekt ist die Möglichkeit einer Acetat-Carboxylierung nur von untergeordneter Bedeutung (61).

Cutinelli et al. (62) postulieren ebenfalls eine C_2 - C_1 -Addition, um die Ergebnisse interpretieren zu können, die sie bei *Rhodospirillum rubrum* erhalten hatten. Dieser Organismus war unter Bedingungen

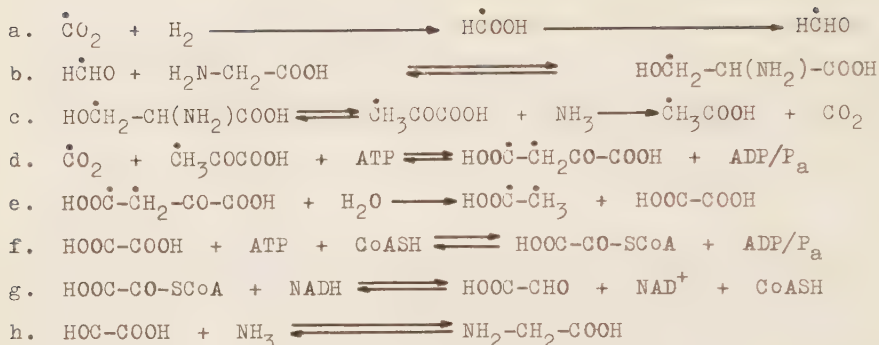
der Photosynthese auf $C^{13}H_3COOH$ und CO_2 bzw. CH_3COOH und $C^{14}O_2$ gewachsen. Das synthetisierte Alanin wurde abgebaut und zeigte eine C^{14} -Markierung in der Carboxylgruppe. Die Carboxylgruppe der Essigsäure war zum α -C-Atom, die Methylgruppe zum β -C-Atom geworden. Ähnliche Experimente mit *E.coli* und Hefe (10) verliefen ergebnislos.

3. Totalsynthese organischer Verbindungen über die CO_2 -Fixierung.

Das erste Beispiel für die Totalsynthese lieferte Wieringa 1936, (63), als er in *Clostridium aceticum* einen Organismus isolierte, der imstande war, aus CO_2 und Wasserstoff Acetat zu bilden. Der Einwand, es handle sich um einen Vertreter der chemotrophen Gruppe, wurde durch die Studien von Karlsson et al. (64) entkräftet, die zeigen konnten, daß Glucose, Glutaminsäure, Biotin, Pyridoxamin und Pantoensäure zum Wachstum notwendig sind.

Bisher wurde eine Reihe von Organismen ermittelt, die ebenfalls Acetat aus CO_2 bilden können. So beschrieben 1940 Barker et al. (65) den Abbau von Hypoxanthin durch *Clostridium acidurici*, bei dem pro Mol umgesetzter Base u.a. 1.25 Mol Essigsäure anfallen. Eine Zugabe von $C^{14}O_2$ führt zu einer gleichmäßigen Doppelmarkierung der C_2 -Fettsäure. Dagegen fixierte *Clostridium cylindrosporum*, ein Organismus, der ähnlich *C. acidurici* Harnsäure in Ammoniak, Essigsäure, Glykokoll und Kohlendioxyd zerlegt, mehr $C^{14}O_2$ in die Methylgruppe des Acetates (66). *Clostridium thermoaceticum*, isoliert und beschrieben von Fontaine et al. (67), setzt ein Mol Glucose in drei Mol Acetat um. Barker und Kamen (68) studierten diesen ungewöhnlichen Gärungsverlauf in Gegenwart von $C^{14}O_2$. Die Verfasser bestätigten, daß Essigsäure einziges Endprodukt ist. Außerdem wiesen sie doppelmarkiertes Acetat nach. Bei *Butyribacterium rettgeri* (69) konnte eine Nettoproduktion von 0.8 Mol CO_2 pro Mol vergorener Milchsäure festgestellt werden. Aus Berechnungen ergab sich, daß 25% des Acetates aus CO_2 synthetisiert wurden. Erwähnenswert ist ferner *Diplococcus glycinophilus*, der eine bemerkenswerte Substratspezifität aufweist und unter anaeroben Bedingungen Glykokoll zu Ammoniak, Essigsäure und CO_2 vergärt. Unter $C^{14}O_2$ wurde im gebildeten Acetat mehr Aktivität in der Carboxyl- als in der Methylgruppe gefunden (70,71).

Der Mechanismus, über den eine Totalsynthese verläuft, wurde bislang nicht geklärt. Wood (10) stellt folgende Reaktionen zur Diskussion:



Die Reaktionen a - c würden zu methylmarkiertem Acetat führen und d - e zur Doppelmarkierung. Die Spaltung des Oxalacetates zu Acetat und Oxalat wurde von Hayaishi et al. (72) bei *Aspergillus niger* festgestellt. Den Reaktionen f - g wird von Quayle und Keech (73) bei *Pseudomonas oxalaticus* eine wichtige Rolle zugeschrieben. In Reaktion h wird durch Aminierung der Glyoxylsäure das Glycin regeneriert, das dann über die Reaktion b einen Synthesekreislauf schließt. Obige Reaktionsfolge würde zur Interpretation der Versuchsergebnisse genügen, die bei *Diplococcus glycinophilus*, bei *Clostridium cylindrosporum* und *C. acidurici* erhalten wurden. Lentz (74), Pine und Barker (75) halten dagegen im Falle von *C. thermoaceticum* und *Butyrivibrio reutgeri* selbst einen Mechanismus für unwahrscheinlich, der nur Teilreaktionen des geschilderten Zyklus aufweisen würde. Die bei diesen Organismen geringe Markierung des C₃-Atoms in der Milchsäure und im Serin schließt aus, daß zu Formaldehyd reduziertes C¹⁴O₂ mit Glykokoll zu Serin kondensiert.

Von den heute bekannten und in der Übersicht dargestellten Mechanismen der CO₂-Fixierung sind in den einzelnen Organismen weder alle verwirklicht, noch dürften die vorhandenen mengenmäßig von gleichgroßer Bedeutung sein. Vergleicht man nämlich die bereits vorliegende und an anderer Stelle noch genauer zu zitierenden Literatur, so ist die überraschende Bedeutung der Wood-Werkman-Reaktion als Typ der C₃-C₁-Addition unverkennbar. Sie führt zur Synthese der für den Stoffwechsel so wichtigen C₄-Säuren. Daneben konnten Moses et al., 1958, (16) weitere Mechanismen nachweisen, die der Nettosynthese von Kohlendioxyd dienen. So betrug bei *Zygorhynchus moelleri* der Einbau von C¹⁴O₂ in Ribulose-5-Phosphat unter Bildung von 6-Phosphogluconsäure bereits

nach vier Sekunden 11 % der Aktivität, die in der löslichen nicht-flüchtigen Fraktion enthalten war. Ferner erhielten die Verfasser nach zwei Minuten eine deutliche Markierung der Nucleotide und Nucleotidzucker.

Die Prüfung heterotropher Organismen auf ihre Fähigkeit, Kohlendioxyd zu fixieren, geschieht am einfachsten, indem man sie in Gegenwart von $C^{14}O_2$ wachsen läßt. Nach mehreren Stunden oder Tagen können dann die im Plasma gelösten markierten Produkte und die Proteinfraction der geernteten Zellen untersucht werden. Allerdings lassen sich die primären Fixierungsreaktionen bei allen diesen langen Versuchszeiten nicht bestimmen. Um diese Frage zu klären, ist die $C^{14}O_2$ -Fixierung über kurze Zeiten mit gewaschenem, konzentriertem Zellmaterial die Methode der Wahl. Die Zahl der markierten Verbindungen ist dann überschaubar. Die Aufarbeitung intra- und extrazellulärer Substanzen gestaltet sich einfach und wird nicht durch das Nährmedium erschwert oder gar unmöglich gemacht. Auf diese Weise erhielten Lynch und Calvin, 1952, (77) mit Suspensionen ruhender Zellen von elf verschiedenen Organismen, darunter aeroben und anaeroben Vertretern, sowie einigen Pilzen, nach 40 Minuten recht eindrucksvolle Ergebnisse.

Läßt man gewaschene Zellen $C^{14}O_2$ in Abhängigkeit von der Zeit fixieren, kann der Weg des radioaktiven Kohlenstoffs im Stoffwechsel verfolgt werden. Diesem Verfahren, das zuerst von Calvin et al. (78) zur Aufklärung der CO_2 -Assimilation in Photosyntheserversuchen angewendet wurde, liegt eine ohne weiteres einleuchtende Überlegung zugrunde. Die Fixierung des $C^{14}O_2$ über einen oder mehrere der bekannten Mechanismen führt nach einer sehr kurzen Zeit zur fast ausschließlichen Markierung der Synthese- oder ihrer unmittelbaren Folgeprodukte. Diese werden also bei einer prozentualen Aufschlüsselung der Gesamtfixierung den höchsten Prozentsatz aufweisen. In Abhängigkeit von der Fixierungsdauer und der Poolgröße (Sammelbecken) der Primärprodukte wird dann das C^{14} über den Stoffwechsel in Sekundärprodukte gelangen. Daraus folgt ein Anstieg im prozentualen Anteil dieser Verbindungen, während der Prozentsatz der Primärprodukte zwangsläufig sinkt. In der angelsächsischen Sprache spricht man von einem positiven bzw. negativen "slope" der entsprechenden Kurven.

Die vorliegenden Untersuchungen sollen zeigen, welche Hauptprodukte der bekannten C_3 - C_4 -Addition bei Mikroorganismen verschiedener systematischer Stellung auftreten und in welchem Maße andere Mechanismen des CO_2 -Einbaus an der Gesamtfixierung beteiligt sind.

B. Methodik.

I. Material und Kulturmethoden.

Die Anzucht der Organismen erfolgte in komplexen Medien (500 ml) meist als Schüttelkulturen. Soweit nicht besondere Temperaturbedürfnisse vorlagen, wurde bei Zimmertemperatur (ZT) bebrütet. Die Kulturbedingungen sind in Tab.1 zusammengestellt.

Kulturmedien:

Abkürzungen.

Zusammensetzung.

HD = Hefeextrakt-Dextrose: 5 g Hefeextrakt, 10 g Pepton, 5 g Dextrose, 1 l H₂O, pH 6.8 .

HL = Hefeextrakt-Laktat : 5 g Hefeextrakt, 10 g Pepton, 24 ml Natriumlaktat (50%), 1 l H₂O, pH 6.8 .

W = Würze : Vorder- oder Trübwürze (1:1 verdünnt), pH 6.8 .

TB = Tomatenbouillon : 100 ccm Tomatensaft, 7.5 g Trypton, 7.5 g Pepton, 20 g Dextrose, 5 g Kochsalz, 6 g Hefeextrakt, 0.5 g lösliche Stärke, 900 ml H₂O, pH 6.8, 1 g Tween 80.

ST = Standard- : 3 g Fleischextrakt, 5 g Pepton, 5 g NaCl, 1 l H₂O
medium pH 6.8.

MRS= Nährmedium nach DeMan, M.Rogosa und M.E.Sharpe (79) :

10 g Trypton, 10 g Fleischextrakt, 7 g Hefeextrakt,
20 g Glucose, 2 g K₂HPO₄, 5 g Natriumacetat (3 H₂O),
2 g Triammoniumcitrat, 200 mg MgSO₄(7 H₂O), 50 mg
MnSO₄(4 H₂O), 1 l a.d., pH nach 15 min Ster. 6.0 -
6.5/12°C (vorher 6.2-6.6), 1 ml Tween 80.

Sp₁ = Nährmedium für Escherichia coli:

3g Fleischextrakt, 5 g Pepton, 5 g Glucose, 1 l H₂O
pH 6.8.

Sp₂ = Nährmedium für Streptomyces:

10 g Glucose, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 0.1 g
FeSO₄(7 H₂O), 0.25 g MgSO₄(7 H₂O), 1 l H₂O, pH 6.8 .

Das Zellmaterial wurde in der späten Wachstumsphase gewonnen. Die ohne zusätzliche Belüftung herangezogenen Pilzkulturen waren in der Regel grobflockig und daher auch physiologisch sehr heterogen (vgl.

Kulturart: Beimpfung: Gasphase:
 SK = Schüttelkultur. V = Vorkultur. L = Luft.
 ST = Standkultur. S = Schrägröhrchen- N₂ = Stickstoff.
 abstrich.
 M = Versportes Myzel.

Tab. 1

Organismus:	Medium:	Kultur- art:	Beimpfung:	Temp.: °C	Gas- phase:
Lactobazillen	TB	ST	V	37	N ₂
Sc. lactis	MRS	ST	V	30	N ₂
Prop. freuden- r reichii	HL	ST	V	27	N ₂
Pseudomonas pyocyanea	ST	ST	V	27	L
Corynebact. nephridii	HD	Sk	S	27	L
Arthrobact. suboxydans	HL	Sk	V	27	L
Bac. coagulans	TB	ST	V	37	L
Strept. griseus	Sp ₃	Sk	S	27	L
Nocardia rubra	HD	SK	S	27	L
" flava	HD	SK	S	27	L
Mycobacterium phlei	HD	SK	S	27	L
Microc. lyso- dekticus	ST	SK	S	27	L
Sarcina flava	ST	SK	S	27	L
Staph. aureus	HD	SK	S	27	L
Escherichia coli	Sp ₂	ST	S	27	L
Aerobacter aerogenes	HD	SK	S	27	L
Serratia marcescenz	HD	SK	S	27	L
Flavobacterium spec.	HD	SK	S	27	L
Phycomycetes "	W	SK	M	27	L
Ascomycetes "	W	SK	M	27	L

" = Abkürzungen s.S.16.

" = Klassenzugehörigkeit der untersuchten Organismen.

d.a. J.W.Foster: Chemical Activities of Fungi (3)). Traten infolge des Schüttelns größere Myzelzusammenballungen auf, wurden diese nach Entfernen des Nährmediums mit der Pinzette vorsichtig zerkleinert. Die geernteten Zellen wurden einmal, Pilzmyzel zweimal mit Phosphatpuffer (pH 6.2 / m/100) gewaschen und dann im gleichen Puffer resuspendiert.

II. Versuchsanordnung:

Ein Rotationsschüttler erhielt einen ringförmigen Aufsatz, der acht Metallmanschetten zur Befestigung der Fixierungsgefäße trug. Die Gefäße waren mit einem Schliffhahn, einem Seitenstutzen mit Gummikappenverschluss und einem plangeblasenen Boden versehen (Abb. 1/2).

Es wurden pro Gefäß 3 ml Zellsuspension einpipettiert. Der dünne Flüssigkeitsfilm, der den Boden des Fixierungsgefäßes (30 cm²) überzog, gewährleistete bei einer mittleren Schichtdicke von 1 mm einen guten Gasaustausch. Bei Pilzen war es allerdings notwendig, mit 8-10 ml Puffer das Myzel gleichmäßig im Gefäß zu verteilen. Die Zellsuspensionen der aeroben Organismen wurden vor der Bicarbonatgabe fünf Minuten mit Luft durchspült, die der anaeroben Vertreter mit Stickstoff. Dann wurden 0.2 ml m/100 NaHCO₃¹⁴ = 40 μ C eingespritzt. Die Abtötung erfolgte mit heißem 96-%igen Alkohol (Endkonzentration 75 %). Zur Bestimmung des flüchtigen Anteils an der Gesamtfixierung wurden die Zellen durch Erhitzen auf ca 80°C in einem kleinen Wasserbad abgetötet, nachdem das Gefäß der Schüttelvorrichtung entnommen und der Schliffhahn mit einem kleinen Rückflusskühler versehen war, der nach der Prozedur gründlich gespült wurde.

In vielen Fällen wurden pro Organismus mehrere Versuchsserien durchgeführt, die aus jeweils zwei bis fünf Proben bestanden und in den Tabellen folgendermaßen gekennzeichnet wurden: 1,2,3 = Versuchsserie; 1a,1b,1c/2a,2b,2c,2d,2e = Proben. Das in jeder einzelnen Versuchsserie verwendete Zellmaterial stammte aus wachsenden Kulturen, die unabhängig von einander herangezogen worden waren. Unter diesen extremen Bedingungen sollte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse geprüft werden.

III. Aufarbeitung:

a. Flüchtige Fraktion.

Um den prozentualen Anteil der leichtflüchtigen markierten Produkte

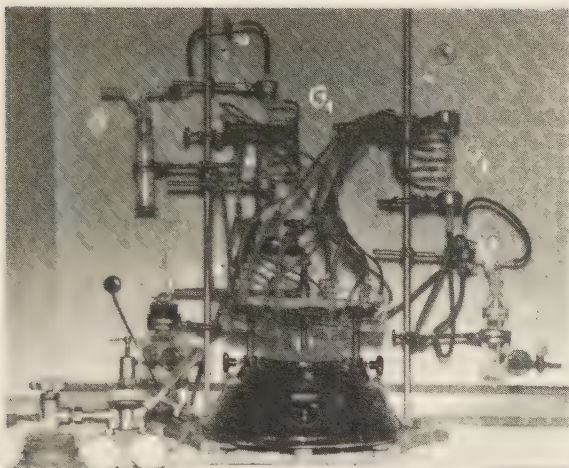


Abbildung 1. Apparatur für die Untersuchung der $C^{14}O_2$ -Fixierung bei Mikroorganismen.

A = Mit Natronkalk gefülltes Absorptionsgefäß zur Gewinnung CO_2 -freier Luft.

G_1 = Glasrechen mit Schlauchanschlüssen für die Injektionsnadeln.

B = Mit 50-%iger Natronlauge gefülltes Absorptionsgefäß für überschüssiges $C^{14}O_2$.

G_2 = Glasrechen mit Schlauchanschlüssen für die Schliffhähne.

U = Umschaltvorrichtungen zur Luft- und Gasspülung ohne Einschaltung der Absorptionsgefäße.

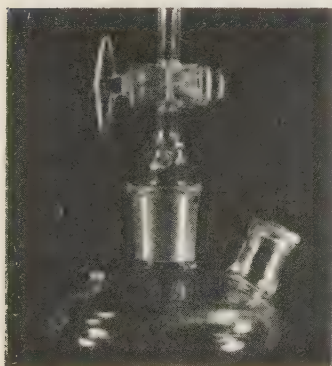


Abbildung 2.

$C^{14}O_2$ -Fixierungsgefäß.

(14)

an der Gesamtfixierung später errechnen zu können, wurde zunächst die Radioaktivität der nichtflüchtigen, löslichen und unlöslichen Bestandteile dieser speziell behandelten Probe gemessen. Die sich anschließende Aufarbeitung der Suspension richtete sich in ihren Grundzügen nach Methoden, die von Neish et al. (80) zusammengestellt wurden. Das Schema 1 gibt einen kurzen Überblick über die im Detail noch zu besprechenden Aufarbeitungsschritte.

Um jederzeit die einzelnen Arbeitsgänge kontrollieren zu können, wurden je $10 \mu\text{Mol}$ verschiedener Trägersubstanzen zugegeben:

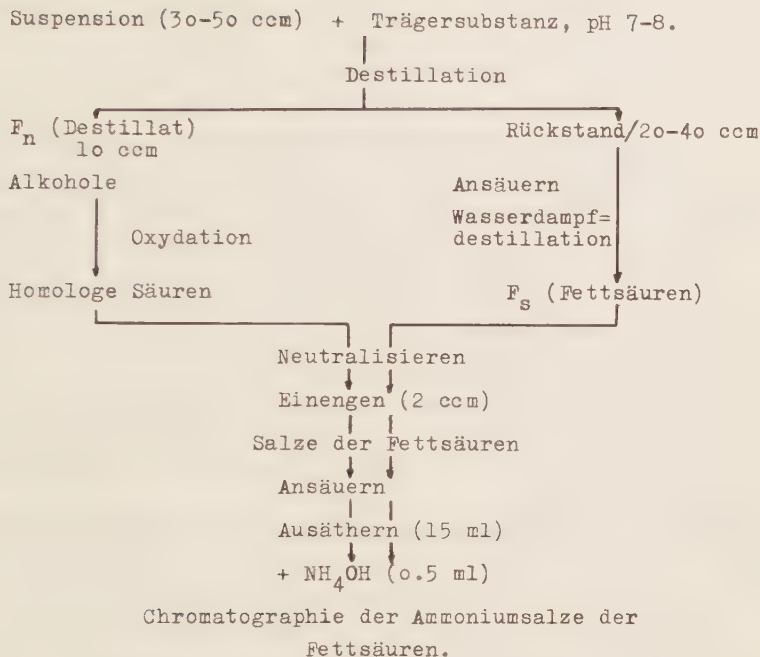
Alkohole: Methanol, Äthanol, Propanol, Butanol.

Säuren : Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure.

Das Ausgangsgemisch (abgetötete Zellsuspension / 30-50 ccm) wurde mit etwas Indikatorgemisch (Phenolrot - Thymolblau 0.1% a.d.) versetzt und mit $n/10$ NaOH auf pH 7-8 eingestellt. Bei der nun folgenden Destillation wurden 10 ccm Destillat (F_n) in eisgekühlter Vorlage aufgefangen. Sie enthielten $90 \pm 10 \%$ des eingesetzten Alkoholgemisches. Die Gewinnung der flüchtigen Säuren erfolgte dann nach Ansäuern des "Rückstandes" mit 10 ml $10 n \text{ H}_2\text{SO}_4$ durch wasserdampfdestillation nach Wiesenberger (81), die erst dann abgebrochen wurde, wenn das Destillat (F_g) an Volumen das Dreifache des Ausgangsgemisches erreicht hatte. Das die flüchtigen Säuren enthaltende Destillat wurde mit $n/10$ NaOH gegen Neutralrot titriert.

Die Alkohole wurden mit 50 ccm Bichromatlösung bei Zimmertemperatur oxydiert. (9.8 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ werden in 500 ml $10 n \text{ H}_2\text{SO}_4$ aufgelöst. 100 ml dieser Lösung werden mit $19 n \text{ H}_2\text{SO}_4$ auf 1000 ml aufgefüllt.) Das hier gewählte Verhältnis Destillat : Bichromatlösung = 1 : 5 war die untere Grenze einer noch quantitativen Oxydation der Alkohole zu den homologen Säuren. Nach dreißig Minuten wurde das Gemisch auf 150 ml mit Wasser verdünnt, mit einem Überschuß an NaHSO_3 das unverbrauchte Bichromat reduziert und mit $n/10 \text{ KMnO}_4$ bis zum Umschlagspunkt (gelbgrün-violett) zurücktitriert. Ebenfalls titriert wurde eine gleichbehandelte Blindprobe des Oxydationsgemisches, um aus dem Differenzbetrag beider Titrations den quantitativen Verlauf der Alkoholoxydation errechnen zu können. Die Jod-Thiosulfat-Methode (Neish et al. 80) konnte nicht verwendet werden, da die Reaktionsprodukte bei der weiteren Aufarbeitung stören. Das obige schwefelsaure Gemisch der niederen Fettsäuren wurde der Wasserdampfdestillation unterworfen. (Ausgangsgemisch : Destillat = 1:2/Titration gegen

Schema 1:



Neutralrot). Die Destillate der Fraktionen F_n (Alkoholoxydation) und F_s (flüchtige Fettsäuren) wurden leicht alkalisch gemacht und zur Trockne eingedampft. Die Radioaktivität der in jeweils 2 ml Wasser gelösten Salze wurde bestimmt.

Erwies sich eine Identifizierung der flüchtigen Produkte als wünschenswert (hoher prozentualer Anteil an der Gesamtfixierung), wurden obige Lösungen angesäuert, die Fettsäuren mit 15 ml Äther extrahiert und durch Zugabe von 0.5 ml konz. Ammoniak in die Ammoniumsalze übergeführt. Nach Abdampfen des Äthers unter $30^{\circ}C$ wurde das Gemisch dann chromatographiert.

b. Nichtflüchtige, lösliche und unlösliche Fraktion.

Nach Messung der Gesamtaktivität wurde das Zellmaterial mit 70-, 50- und 20-%igem Alkohol extrahiert und mit Wasser gewaschen. Die gesammelten Eluate wurden in einem Büchi-Vakuum-Rotationsverdampfer bzw. im Wasserbad durch Aufblasen von Luft bei $50-70^{\circ}C$ auf 2 ml eingengt und chromatographiert.

Um die im Rückstand festgelegte Radioaktivität zu erfassen, wurde dieser in wenigen Millilitern Wasser resuspendiert - grobes Myzel zuvor homogenisiert - und gemessen.

Die Hydrolyse des unlöslichen Proteins wurde mit 6 n HCl (10 ml/ 25 mg Protein) im Einschlußröhrchen unter Stickstoff 36 Stunden bei 110°C vorgenommen. Die gebildeten Huminstoffe ließen sich durch Zusatz von wenig Tierkohle entfernen, was die papierchromatographische Trennung erleichterte und gestattete, größere Mengen aktiver Substanz aufzutragen. Wie eingehende Tests ergaben, erfolgte keine selektive Absorption löslicher Hydrolysenprodukte z.B. Basen der RNS und DNS. Die Hydrolysate wurden zweimal im Wasserbad durch Aufblasen von Luft zur Trockne eingengt, zuletzt in wenig Wasser aufgenommen, die Gesamtaktivität bestimmt und chromatographiert.

In einigen Fällen wurde das Protein erst hydrolysiert, nachdem die Desoxyribonucleinsäure und die Ribonucleinsäure enzymatisch mit Desoxyribo- und Ribonuclease in lösliche Bestandteile umgewandelt und abgetrennt worden war.

Der Rückstand (Protein, RNS, DNS) wurde in 2 ml m/100 Triäthanolamin-Hydrochlorid-Puffer (pH 7.0) aufgenommen und zwei Stunden bei 37°C mit RN-ase inkubiert. Dann wurde dem Ansatz DN-ase und $MgCl_2$ (0.025 M/l = Endkonzentration) beigemischt. Nach weiteren zwei Stunden wurde nach Zusatz von Alkohol kurz aufgeköcht, zentrifugiert, der Überstand mit 1.5 ml konz. HCl (4n = Endkonzentration) versetzt und eine Stunde im Wasserbad bei 100°C hydrolysiert, um die 2',3'-Nucleotide in Nucleoside und Basen zu überführen. Die Hydrolysate wurden anschließend in der oben beschriebenen Weise aufgearbeitet und chromatographiert.

Bei Verwendung des obigen Puffers ist es angebracht, das Triäthanolamin vor Zusatz der Salzsäure aus leichtalkalischem Medium auszuäthern, um Störungen bei der Chromatographie zu vermeiden.

IV. Trennung und Identifizierung der radioaktiv markierten Produkte.

1. Chromatographie.

Von den eingengten Fraktionen wurden pro Aufarbeitung in der Regel drei Parallelchromatogramme mit unterschiedlichen Substanzmengen angefertigt. Die Trennung erfolgte wahlweise im zwei- und eindimensionalen Verfahren.

Papier: Schleicher & Schüll 2043 b.

Die Lage der radioaktiven Substanzen wurde durch Exponieren der Chromatogramme auf AGFA-Röntgenpapier ermittelt. Die Einwirkungsdauer wurde

so verbessern, daß ein Fleck mit 0.5-1 % der am Ursprung eingesetzten Impulse eine deutliche Verwarzung ergab. Als Faustregel gilt, daß Flecken mit 100 lpm nach ungefähr drei Wochen auf dem Autoradiogramm gut sichtbar sind.

a. Chromatographie der Ammoniumsalze flüchtiger Fettsäuren.

Das Gemisch der Ammoniumsalze wurde im kalten Luftstrom auf das Chromatographiepapier aufgetragen und eindimensional, aufsteigend in nachstehendem Butanol-Ammoniak-Gemisch getrennt.

Butanol-Ammoniak-Gemisch (82) : 100 ml NH_4OH (25 %), 900 ml aqua dest.
1 000 ml Butanol.

Eine evt. Aufbewahrung der Chromatogramme erfolgt am zweckmäßigsten in einem mit Ammoniakdampf gesättigten Behälter, da die häufig sauer reagierende Laboratoriumsluft ein langsames Abdiffundieren der freigesetzten Fettsäuren ermöglicht.

b. Chromatographie der nichtflüchtigen, löslichen und unlöslichen, hydrolysierten Fraktionen.

Die Trennung der Substanzen erfolgte zweidimensional in dem von Benson et al. 1950 (83) ausgearbeiteten System.

Laufmittel: 1. Phase: (I) Wassergesättigtes Phenol. Laufzeit: 36 h.

2. Phase: (II) Butanol-Propionsäure-Wasser. Laufzeit: 12 h.

Butanol-Wasser : 750 : 50

Propionsäure-Wasser: 448 : 352

Das Gemisch muß im Verhältnis 1 : 1 immer frisch bereitet werden (Esterbildung).

Zur besseren Trennung der phosphorylierten Verbindungen (Nucleotide, Zuckerphosphate u.ä.) wurde das Laufmittel der 1. Phase abgewandelt:

1680 ml Phenol-Wasser (83 %) - 680 ml aqua dest. - 2 ml π /l EDTA - 20 ml Eisessig. (Moses, pers. Mittlg.)

Im Vergleich zu den von Benson et al. (83) für die einzelnen Verbindungsklassen ausgearbeiteten zweidimensionalen Verteilungsschemata wurde bei den übrigen Substanzen nur eine geringfügige Verschiebung der Di- und Tricarbonsäuren zur Lage der Aminosäuren festgestellt. Abb. 3 zeigt die typische Verteilung der bei der heterotrophen CO_2 -Fixierung vorkommenden markierten und identifizierten Produkte im

abgewandelten Laufmittelsystem. Dieses durch zahlreiche Testläufe überprüfte und gesicherte Schema wurde der Auswertung der Radioautogramme zugrunde gelegt.

2. Cochromatographie:

Um die Identifizierung der radioaktiv markierten Substanzen zu erleichtern, wurden bereits in den Originalchromatogrammen Testgemische verschiedener Aminosäuren, Nucleotide und Nucleoside den einzelnen Fraktionen beigemischt. Dies führte nur dann zu befriedigenden Ergebnissen, wenn das günstige Verhältnis des "heißen" zum "kalten" endogenen Materials ein zusätzliches Beladen des Papiers mit Trägersubstanzen erlaubte, ohne die saubere Trennung des Stoffgemisches zu beeinträchtigen.

Traten bei der Auswertung der Chromatogramme Zweifel an der Identität einer markierten Substanz auf, wurde sie mit wenig Wasser eluiert und mit der vermuteten, chemisch reinen Verbindung in einem oder mehreren der nachstehenden Laufmittel ein- bzw. zweidimensional cochromatographiert.

Zusammenstellung der für die Cochromatographie verwendeten Laufmittel.

a. Trennung der nicht-flüchtigen, aliphatischen Säuren:

Phenol-Wasser (3 : 1) + 1 % konz. Ameisensäure. Aufsteigend.

Testmenge: 100 μ l, m/100 der Trägersubstanz. Nachweisreagenz: Glucose-
(s.d. Cramer, 1958 (76)) Anilin.

b. Trennung der Aminosäuren:

Propanol-konz. Ammoniak: 7 : 3, aufsteigend.

Testmenge: 30 μ l, m/100 der Trägersubstanz. Nachweisreagenz: Ninhydrin.
(s.d. Cramer, 1958 (76))

c. Trennung der Nucleotide, Nucleoside und Basen.

c₁. Kochsalzlösung (0.8 M). (Landerath, 1962 (84))

Polyäthylenimin-imprägniertes Papier. Absteigend.

Testmenge: 100 μ g. Nachweis: UV-Minerallicht.

c₂. Isobuttersäure-konz. Ammoniak-Wasser: 66 : 1 : 33. (Pabst Lab.
Circular Nr.
OR-10)

Absteigend. Testmenge: 100 - 150 μ g.
Nachweis : UV-Minerallicht.

Nachstehend seien die R_F -Werte aufgeführt:

ATP	: 0.26	UTP	: 0.07	CTP	: 0.07	GTP	: 0.11
ADP	: 0.34	UDP	: 0.17	CDP	: 0.27	GDP	: 0.17
AMP	: 0.48	UMP	: 0.26	CMP	: 0.46	GMP	: 0.25
Adenosin:	0.76	Uridin	: 0.47	Cytidin:	0.59	Guanosin:	0.46
Adenin	: 0.85	Uracil	: 0.63	Cytosin:	0.75	Xanthin	: 0.48
Inosin	: 0.44	Orotsäure:	0.28	Thymin	: 0.73	Thymidin:	0.54
Methylcytosin: 0.83							

Die Methode von Mazur et al., 1962 (85), Nucleotide und andere N-H-enthaltende Verbindungen nach Behandlung mit tertiärem Butylhypochlorid durch Besprühen mit einer Kaliumjodid- und Stärkelösung sichtbar zu machen, ist unter Verlust der eingesetzten Substanz sehr geeignet und erlaubt den Nachweis sehr geringer Mengen (58).

2.3. Zweidimensionale Trennung der Nucleoside, Basen und Zucker.

1. Phase: (II) : Butanol-Propionsäure-Wasser (s.S.23).

2. Phase: (III) : Butanol-Pyridin-Wasser: 6 : 4 : 3.

Der Vorzug dieses Systems liegt darin, daß sich aus einem Gemisch von Aminosäuren, Di- und Tricarbonsäuren Zucker, Nucleoside und deren Basen heraustrennen lassen (s.d.Abb.4).

Bei der von Benson et al. (83) (s.S.23) ausgearbeiteten Laufmittelkombination liegt der Vorteil in der ausgezeichneten Trennung sehr heterogener Substanzgemische, der Nachteil jedoch in der unvermeidlichen Überschneidung wichtiger Verbindungen, die markiert sowohl bei der heterotrophen $C^{14}O_2$ -Fixierung, als auch in Photosyntheseversuchen mit $C^{14}O_2$ auftreten können. Die prozentuale Aufschlüsselung dieser Mischflecken gelingt in den meisten Fällen ohne zeitraubende Rechromatographie der Flecken des Originalchromatogramms, wenn man zusätzlich das oben angeführte System verwendet.

3. Identifizierung phosphorylierter Verbindungen.

Die saubere Trennung phosphorylierter Verbindungen gestaltet sich oft recht schwierig und hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab. So stören u.a. bereits relativ kleine Mengen Salz (Puffer), Trocknen der auf das Chromatographiepapier aufgetragenen Gemische in zu heißem Luftstrom und geringfügige Änderungen in der Laufmittelzusammensetzung. Ferner findet bei den Nucleosidtri- und diphosphaten eine laufende Zersetzung zu den Monophosphaten statt, was die Cochromatographie außerordentlich erschwert. Schema 2 zeigt die Auftrennung

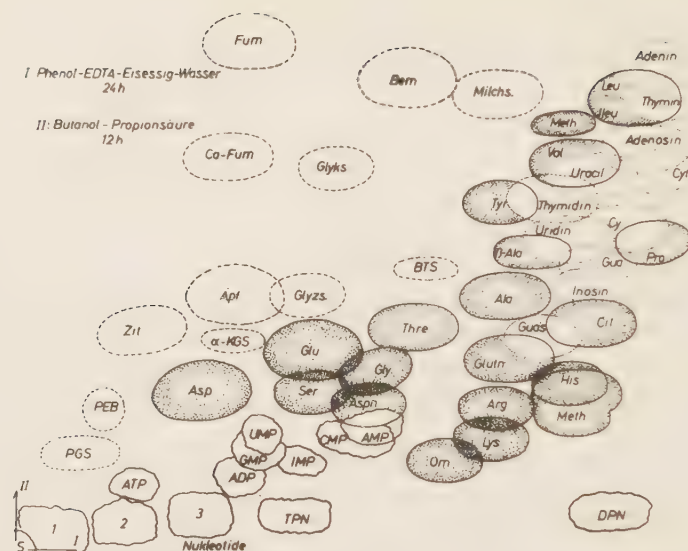


Abb. 3. Chromatographische Auftrennung der bei heterotrophen Mikroorganismen im Verlauf der $C^{14}O_2$ -Fixierung auftretenden C^4 -markierten Aminosäuren, organischen Säuren, Pyrimidin- und Purinverbindungen im zweidimensionalen System nach Benson et al. (63), abgeändert nach der Vorschrift von Moses (S.d.S.23 ff.). Abkürzungen und Zeichenerklärung = S. 31.

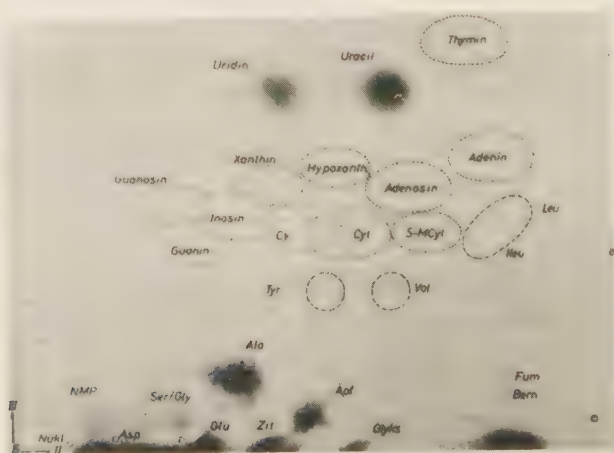


Abb. 4. Chromatographische Auftrennung der bei heterotrophen Mikroorganismen im Verlauf der ^{14}C -O₂-Fixierung auftretenden ^{14}C -markierten Aminosäuren, Pyrimidin- und Purinverbindungen im zweidimensionalen System:
II. Butanol-Propionsäure-Wasser. III. Butanol-Pyridin-Wasser.
(S.d.Meth.S.25. Abkürzungen und Zeichenerklärung S. = 31.)

eines Gemisches aus ATP, ADP und AMP in einem Testchromatogramm.

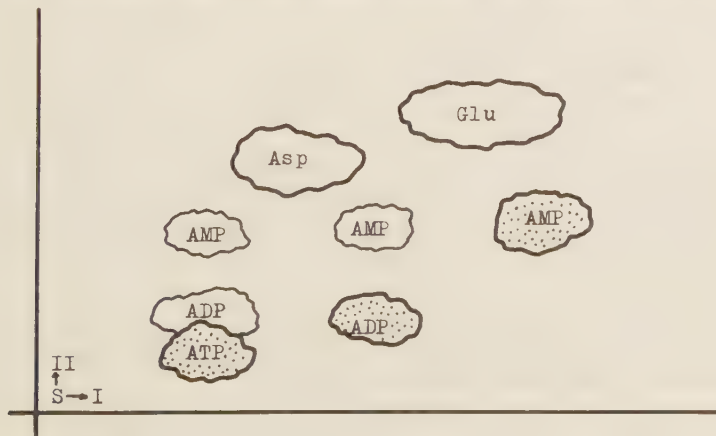
Die relative Lage der Nucleosidmonophosphate zu den als "Fixpunkte" benutzten Aminosäuren schwankt erheblich. Calvin et al. (83) konnten als Ursache hierfür unterschiedliche pH-Werte des Substanzgemisches am Start ermitteln.

Bei der Cochromatographie mit chemisch reinen Substanzen - sofern sie ohne weiteres erhältlich sind - führen die chemischen Nachweisreaktionen häufig zum Verlust der zu prüfenden Substanz oder zu unbrauchbaren Verschmierungen, wenn zu den papiereluateten relativ große Mengen an Vergleichssubstanzen gegeben werden müssen, um scharfe Konturen der Flecken zu erhalten. Genügen z.B. bei den Nucleotiden bereits 30-50 μ g, um die UV-Absorption sichtbar zu machen, so müssen 150-200 μ g eingesetzt werden, um einwandfrei feststellen zu können, ob sich die markierten Verbindungen mit den Testsubstanzen genau decken.

Es erwies sich daher im Verlauf der Arbeiten als vorteilhaft, die Phosphatverbindungen nicht als solche zu cochromatographieren, sondern enzymatisch zu dephosphorylieren und als Zucker, Säuren, Nucleoside oder Basen zu identifizieren.

Dephosphorylierung der Phosphatester mit Polydase S.

Die eingeeengten Fraktionen der nichtflüchtigen löslichen Substanzen wurden in einigen Fällen in zwei gleiche Portionen geteilt, von denen die eine mit Polydase S (Schwarz Bioresearch Inc. Mount Vernon N.Y., vor Gebrauch zwei Tage gegen Wasser dialysiert) in m/50 Acetat-



Schema 2. S.S.25.

puffer pH 5.2 versetzt und 12 h bei Zimmertemperatur inkubiert wurde, während die andere unbehandelt blieb. Die von beiden Proben angefertigten Chromatogramme wurden dann verglichen. Aus den Verschiebungen im prozentualen Anteil der Glycerinsäure, Brenztraubensäure, Gluconsäure, Zucker u.ä. vor und nach Polydaseeinwirkung kann auf gespaltene Phosphatverbindungen geschlossen werden.

Dephosphorylierung der Nucleosidmonophosphate mit 5'-Nucleotidase.

Die Untersuchungen von Heppel und Hilmoe 1950 (86) zeigen, daß die im Prostatasekret des Bullensamens vorhandenen Enzyme sowohl 5'-Nucleosidmonophosphate als auch eine Reihe von Phosphatestern spalten. Um alle diese Eigenschaften zu erhalten, wurden lediglich die Spermien abzentrifugiert und der Überstand für die Versuche verwendet.

Die zu untersuchenden Phosphatverbindungen wurden aus den Chromatogrammen mit Wasser eluiert, die Eluate auf 1.6 ml eingeeengt und mit 0.4 ml konz. HCl versetzt (Endkonzentration 2 N). Dann wurde im Wasserbad bei 100°C durch Aufblasen von Luft wie bereits beschrieben (S.22) dreimal zur Trockne eingedampft. Die Phosphatester wurden in 1.0 ml m/10 Glykokollpuffer pH 8.5 resuspendiert und nach Zugabe von 0.1 ml $MgCl_2$ (0.1 M) und 50-100 μ l Prostatasekret vier Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurde nach Zusatz von Alkohol und kurzem Aufkochen das ausgeflockte Protein abzentrifugiert, der Überstand eingeeengt und mit einem Gemisch der wichtigsten Nucleoside und einigen Aminosäuren als Leitsubstanzen im normalen System (s.S.23) zweidimensional chromatographiert.

4. Abbau radioaktiv markierter Verbindungen.

Die radioaktiv markierten Verbindungen wurden chromatographisch gereinigt, eluiert und mit chemisch reiner Substanz als Träger gemischt. Aliquote Mengen wurden dann für die einzelnen Umsetzungen verwendet. Das freigesetzte Kohlendioxyd wurde in Barytlauge absorbiert und die Radioaktivität des $BaCO_3$ in unendlicher Schichtdecke gemessen.

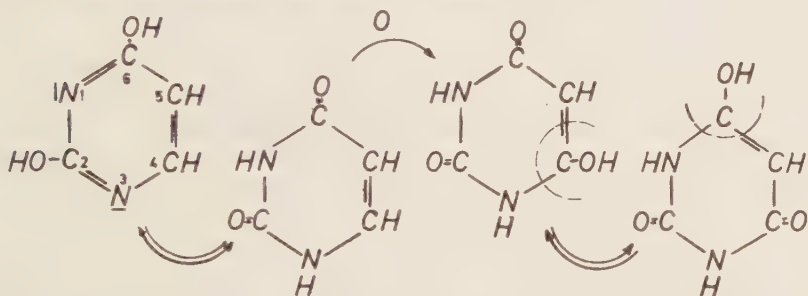
a. Totaloxydation.

Der Totalabbau der organischen Verbindungen zu CO_2 und H_2O wurde mit dem Van-Slyke-Reagenz durchgeführt (88).

b. Abbau des Uracils: (Heinrich und Wilson, 1950 (87)).

200 μ Mol Uracil, gelöst in 3-4 ml Wasser, werden in einer CO_2 -

freien Apparatur mit 0.4 n KMnO_4 -Lösung in Portionen zu 0.5-1.0 ml unter Zugabe einiger Tropfen 0.5 n H_2SO_4 versetzt. (Gesamtverbrauch bei 25 mg Uracil = 223 μMol : KMnO_4 = 5.0 ml, H_2SO_4 = 0.5 ml) Der pH des Oxydationsgemisches darf den Wert 6.0 nicht unterschreiten. Laut Vorschrift verläuft die Reaktion bei Zimmertemperatur, doch kann - wie Tests ergaben- vorsichtig auf 40-50°C im Wasserbad erwärmt werden, um die Spaltung des Pyrimidinringes zu Oxalharnstoff zu beschleunigen. Die Reaktion ist in einer Stunde abgeschlossen. Das in einer Vorlage absorbierte Kohlendioxyd stammt vom Kohlenstoffatom C_4 oder C_6 , da im Pyrimidinring während der Oxydation zwei tautomere Formen auftreten, die im Gleichgewicht stehen:



Das Reaktionsgemisch enthält Kaliumpermanganat im Überschuß. Es wird durch Zugabe von verdünntem H_2O_2 zu Braunstein reduziert, der abfiltriert und mit wenig heißem Wasser ausgewaschen wird. Nach Zugabe von einigen Tropfen 10-%iger Natronlauge zum Filtrat wird durch Erhitzen (5 min!) im kochenden Wasserbad der Oxalharnstoff zu Oxalsäure und Harnstoff hydrolysiert. Mit 5-%iger Essigsäure wird der pH 6.0-6.5 eingestellt und die Oxalsäure unter langsamen Zutropfen von CaCl_2 -Lösung (10%) ausgefällt, der pH 7.5 mit verdünntem NH_4OH eingestellt und abzentrifugiert. Das Calciumoxalat kann dann mit Kaliumpermanganat in saurer Lösung zerlegt werden (C_5/C_6 oder C_5/C_4). Der im Überstand enthaltene Harnstoff kann bei pH 7.5 mit Urease bei 30-37°C gespalten werden (C_2). Es empfiehlt sich allerdings, leicht sauren Phosphatpuffer (pH 6.8) zu verwenden und die Lösung vor der Zugabe des Enzyms 30 Minuten mit Stickstoff zu durchspülen, um gelöstes Kohlendioxyd zu entfernen.

c. Abbau der Glutaminsäure.

Die C^{14} -markierte Glutaminsäure wurde mit Trägersubstanz versetzt, in Wasser gelöst und mit $m/10$ HCl auf pH 2 eingestellt. Eine aliquote Menge ($200 \mu\text{Mol}$) wurde dann unter Zugabe von 5 ml 5 %iger Ninhydrinlösung 30 Minuten gekocht und das Kohlendioxyd (α -C-Atom/ C_1) absorbiert.

Die spezifische Aktivität der C-Atome des Bernsteinsäuresemialdehyds (C_2-C_5) ergab sich aus der Differenz α -Atom zur Totaloxydation.

5. Messung der Radioaktivität und Auswertung der Meßdaten.

Zur Bestimmung der Radioaktivität stand ein Strahlenmeßgerät der Firma Frieske und Höpfner FH 49 und FH 51 und ein Zählgerät des Laboratoriums Prof. Berthold (Wildbach/Schw.) zur Verfügung.

Aliquote Mengen (10-50 μg) der zu messenden Lösungen und Gemische wurden auf Aluminiumplättchen unter Zugabe eines Tropfens 5 %iger Essigsäure ausgestrichen, unter einer Infrarotlampe getrocknet und im 2 π -Methandurchflußzählrohr des FH 51 gezählt. Die Selbstabsorption wurde aufgrund der geringen Schichtdicke vernachlässigt.

Das bei dem Abbau des Uracils und der Glutaminsäure anfallende CO_2 wurde in Barytlauge aufgefangen, deren Überschuß nach Beendigung der Reaktion gegen Phenolphthalein unter Stickstoff titriert wurde. Das abzentrifugierte und gewaschene Bariumcarbonat wurde auf eine Fritte übertragen (Mikrofilterscheiben, 15 mm lichte Weite, Fa. E.M. Sargent, Chicago, U.S.A.), bei 100°C getrocknet, gewogen und die Radioaktivität in unendlicher Schichtdicke im FH 51 gemessen.

Die auf den Röntgenpapieren entwickelten Flecken wurden vor einem Leuchtkasten auf die Chromatogramme durchgezeichnet und mit großflächigen Methandurchflußzählrohren ausgezählt, die als Endfenster eine sehr dünne Kunststoffolie besitzen. Die Summe der auf den einzelnen Flecken gemessenen Impulse wurde prozentual aufgeschlüsselt.

Die Tabellenwerte repräsentieren Mittelwerte von mindesten zwei parallel angefertigten Chromatogrammen.

Abkürzungen und Zeichenerklärungen.

UTP,UDP,UMP	: Uridintrি-, -di- und monophosphat.	Asp	: Asparaginsäure.
CTP,CDP,CMP	: Cytidintrิ-, -di- und monophosphat.	Aspn	: Asparagin.
ATP,ADP,AMP	: Adenosintrิ-, -di- und monophosphat.	Glu	: Glutaminsäure.
AMP, ' ', ''	: Adenosinmono-, -di- und -triphosphat.	Glutn	: Glutamin.
GTP,GDP,GMP	: Guanosintrิ-, -di- und monophosphat.	Gly	: Glykokoll.
IMP	: Inosinmonophosphat.	Ser	: Serin.
NMP	: Nucleosidmonophosphat.	Thre	: Threonin.
OMP	: Orotidinmonophosphat.	Orn	: Ornithin.
1	: Nucleosidtriphosphate.	Lys	: Lysin.
2	: UDPG = Uridindiphosphat= glucose.	Meth	: Methionin.
3	: Nucleosiddiphosphate.	Arg	: Arginin.
Cyt	: Cytosin.	His	: Histidin.
Cy	: Cytidin.	Cit	: Citrullin.
Gua	: Guanin.	Ala	: Alanin.
Gua's	: Guanosin.	Pro	: Prolin.
Thymd	: Thymidin.	Tyr	: Tyrosin.
Thym	: Thymin.	Val	: Valin.
NADP	: Nicotinamid-adenin-di-nucleotidphosphat.	Leu	: Leucin.
NAD	: Nicotinamid-adenin-di-nucleotid.	Ileu	: Isoleucin.
		DAP	: Diaminopimelin-säure.
		Äpf	: Äpfelsäure.
		Zit	: Zitronensäure.
		Fum	: Fumarsäure.
		Ca-Fum	: Calciumfumarat.
		Bern	: Bernsteinsäure.
		Milchs	: Milchsäure.
		Glyks	: Glykolsäure.
		Glyzs	: Glyzerinsäure.
		BTS	: Brenztraubensäure-.
		α-KGS	: α-Ketoglutarsäure.

C. Versuchsergebnisse.

I. Bakterien.

1. Organismen mit überwiegender Fixierung des $C^{14}O_2$ in Asparaginsäure als Folgeprodukt der Oxalessigsäure. Geringe Verteilung der Radioaktivität in Sekundärprodukte.

a. Milchsäurebakterien.

a₁. $C^{14}O_2$ -Fixierung während des Wachstums.

Streptococcus diacetylactis, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* und *L. bulgaricus* wurden in 500 ml Tomatenbouillon eingepflegt und zwei Tage mit 0.5 ml $m/100 NaHC^{14}O_3$ (10 $\mu C/\mu Mol$) inkubiert. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert und nach Messung der Radioaktivität die löslichen Produkte (Aminosäuren, Carbonsäuren, Nucleotide u.a.) mit heißem Wasser extrahiert. Die im Rückstand enthaltenen Polysaccharide und Nucleinsäuren wurden mit 1 n HCl eine Stunde, das Protein mit 6 n HCl zwölf Stunden bei 100°C hydrolysiert. Der prozentuale Anteil der einzelnen Fraktionen an der Gesamtaktivität wurde bestimmt. Die in Tab.2 zusammengestellten Werte zeigen, daß im Gegensatz zu den Hydrolysaten I sowohl die Heißwasserextrakte (HE) als auch die Proteinhydrolysate (Hy II) nur wenig Radioaktivität enthielten.

Der Heißwasserextrakt von *Sc. diacetylactis* wurde chromatographiert. Die in dieser Fraktion enthaltene Aktivität verteilte sich zu 80 % auf die Nucleosidtri-, -di- und -monophosphate, zu 20 % auf die Zuckersphosphate mit möglicherweise geringer Anteil an Phosphoglyzerinsäure. Die Asparaginsäure war nur in Spuren markiert. Im Protein enthielt sie jedoch die gesamte Aktivität.

Bei *Lactobacillus plantarum* wurde im Hydrolysat I die Markierung in den 2'- und 3'-Nucleotiden, deren Basen und in der Glucose gefunden, im Hydrolysat II in Asparaginsäure (90 %), DAP (3.5 %), Uracil (2.9 %) und Adenin (3.2 %).

Die Aufarbeitung des Proteinhydrolysates von *Lactobacillus bulgaricus* ergab, daß nur Asparaginsäure (90 %) und Threonin (10 %) radioaktiv waren.

Über den Einfluß des Kohlendioxyds auf das Wachstum berichten Prescott und Stutts, 1955, (89). Sie ließen *Sc. bovis* in einem Medium wachsen, das als einzige C-Quelle Arginin enthielt. Wurde der Kultur

Organismus	Nähr= medium	Zeit min	t/°C	Gesamtfixg. Ipm	HE %	Hy _I %	Hy _{II} %
Streptococcus diacetylactis	TB	48	30	212 496	1.5	92	6.5
Leuconostoc mesenteroides	TB	48	30	557 364	11	72	17
Lactobacillus plantarum	TB	48	30	357 000	6.0	81	13
Lactobacillus bulgaricus	TB	48	37	2 598 000	3.5	93	3.5

Tabelle 2. C¹⁴O₂-Fixierungen bei Milchsäurebakterien wäh-
rend des Wachstums. Prozentuale Aufschlüsselung
der Gesamtfixierungen in drei Fraktionen. HE = Heißwasserex-
trakt. Hy_I = Hydrolyse I (1h, 1n HCl, 100°C). Hy_{II} = Hydro-
lyse II (12h, 6n HCl, 100°C). TB = Tomatenbouillon.

CO₂ vorenthalten, stellte sie das Wachstum ein. Wurden dagegen die Organismen in Gegenwart eines kompletten Aminosäuregemisches oder hydrolysierten Kaseins kultiviert, wirkte sich der Kohlendioxyd-
entzug nicht nachteilig aus. Das unterschiedliche Angebot der C₄-Ver-
bindungen im Substrat macht also die CO₂-Fixierung über die C₃+C₁-
Addition notwendig oder entbehrlich. Daher war es nicht überraschend,
daß bei den hier untersuchten vier Organismen nur relativ wenig Radio-
aktivität in den Heißwasserextrakten und Proteinhydrolysaten enthal-
ten war, wenn die Organismen in einem komplexen Medium wuchsen. Auf-
schlußreich war jedoch, daß selbst nach der sehr langen Fixierungs-
zeit von 48 Stunden lediglich Asparaginsäure und das sich davon über
den Asparaginsäuresemialdehyd ableitenden Aminosäuren Threonin und
Diaminopimelinsäure (DAP) eine Markierung aufwiesen. Dieses Ergeb-
nis zeigt, daß die C₃+C₁-Addition nur wenige weitere Synthesen er-
möglichst, wenn der Zitronensäurezyklus fehlt, was bekanntlich bei
diesen Organismen der Fall ist.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen spielt die C¹⁴O₂-Fixierung
in die Nucleotide die größere Rolle. Dies läßt sich aus der starken
Markierung der Nucleinsäurespaltstücke in den Hydrolysaten I folgern.
Der in diesen Fraktionen enthaltene, vermutlich geringe Anteil war-
mierter Zucker konnte nicht bestimmt werden.

a₂. C¹⁴O₂-Fixierung und prozentuale Verteilung markierter Produkte in Abhängigkeit von der Zeit und dem Substrat bei gewaschenen Zellen.

Für alle nun folgenden Untersuchungen wurde das Zellmaterial zuvor aus dem Anzuchtmedium geerntet, gewaschen und in Phosphatpuffer resuspendiert. Aliquote Mengen wurden auf die einzelnen Versuchsgläser verteilt und über verschiedene Zeiten (15 sec - 40 min) mit NaHC¹⁴O₃ inkubiert. Häufig enthielten Parallelproben Glucose als Substrat. (Vgl. Meth. S. 16 ff).

a_{2,1}. Lactobacillaceae.

Bei L. plantarum wurde kein Substrat gegeben. In der löslichen Fraktion von Probe 1c (Tab. 3) enthielt die Asparaginsäure fast alle Aktivität.

Der Weg der Asparaginsäurebildung wurde bei den Milchsäurebakterien schon wiederholt untersucht. Lardy et al. (90) konnten nachweisen, daß bei L. arabinosus der Einbau von markierter Zellsubstanz direkt von der Konzentration des Biotins abhängt.

Shive et al. (91) kamen über Versuche mit biotinanalogen Verbindungen zu dem gleichen Ergebnis.

Von den carboxylierenden Enzymen wurden bisher nur die Propionyl-Carboxylase, die Acetyl-Carboxylase, die β-Methylcrotonyl-Carboxylase und die Pyruvat-Carboxylase als biotinabhängig beschrieben. Es muß also angenommen werden, daß bei L. arabinosus die Synthese der Asparaginsäure über die ATP- und biotinabhängige Carboxylierung der Brenztraubensäure verläuft. McDonald (92) bestimmte beim gleichen Organismus die Position des C¹⁴ in der Asparaginsäure und fand die gesamte Aktivität in der β-Carboxylgruppe.

Bei den zwei untersuchten Stämmen von Lactobacillus bulgaricus zeigte sich bei Zugabe von Glucose eine erhöhte C¹⁴O₂-Fixierung (Tab. 3 (4b, 5b, e)). Die fördernde Wirkung der Glucosefütterung kann darauf zurückgeführt werden, daß über die Glykolyse Acceptorsubstanz für die carboxylierenden Reaktionen geliefert wird.

Bei L. bulgaricus 1 ergab die prozentuale Verteilung der markierten Produkte in den nicht-flüchtigen, löslichen Fraktionen (Tab. 5 (3a-c)), daß die Asparaginsäure nach 1 Minute (3a) 78 %, nach 3 Minuten (3b) 94 % und nach 10 Minuten (3c) 88 % der Gesamtaktivität enthielt. Offensichtlich wird die in einer vermutlich ebenfalls biotin-

Nr.	Organismus	Zeit min	t °C	Sub= strat	% E	Gesamtfixg lpm	Lösl. %	Unlös. %
1a	L. plantarum	1	35	-	-	3 800	100	-
1b	"	5	"	-	-	12 600	100	-
1c	"	11	"	-	-	22 272	100	-
2a	L. casei	20	30	-	-	30 000	-	-
2b	"	20	"	Gluc.	0.1	30 000	-	-
3a	L. bulg.1	1	40	-	-	63 516	98	2.0
3b	"	3	"	-	-	317 232	99	1.0
3c	"	10	"	-	-	289 548	99	1.0
4a	L. bulg.B ₂	12	"	-	-	92 230	100	-
4b	"	12	"	Gluc.	0.1	239 360	97	3.0
5a	L. bulg.B ₂	5	"	-	-	7 200	100	-
5b	"	5	"	Gluc.	0.1	38 000	100	-
5c	"	6	"	-	-	13 050	100	-
5d	"	8	"	-	-	40 240	100	-
5e	"	30	"	Gluc.	0.1	159 585	99	1.0
6a	Pediococcus cerevisae	20	30	-	-	34 800	-	-
6b	"	20	"	Gluc.	0.1	38 605	-	-

Tabelle 3. C¹⁴O₂-Fixierung durch gewaschene Zellen von Milchsäurebakterien. Gesamtfixierungen in Abhängigkeit von der Zeit und dem Substrat. %/E = Endkonzentration der Glucose. Lösl.% = Prozentualer Anteil der nicht-flüchtigen, löslichen Fraktion an der Gesamtfixierung. Unlös.% = Prozentualer Anteil der unlöslichen Fraktion an der Gesamtfixierung.
(Beschreibung der Versuchsansätze s.Tab.6, Anm.: Milchsäurebakterien: Gasphase : Stickstoff).

abhängigen Reaktion primär gebildete Oxalessigsäure sofort zu Asparaginsäure aminiert. Da die Verteilung des C¹⁴ durch das Fehlen des Zitronensäurezyklus sehr begrenzt und die Proteinsynthese durch den **Mangel** an essentiellen Aminosäuren (Glutaminsäure u.ä.) blockiert ist, kann es zu einer Anhäufung der Asparaginsäure kommen.

Zu einem geringen Prozentsatz wird die Oxalessigsäure auch zu Äpfelsäure reduziert. Die Abnahme ihres prozentualen Anteils im Laufe der Fixierungszeit erklärt sich wahrscheinlich aus der Abnahme des NADH-Angebotes.

Der relativ hohe Anteil markierter Äpfelsäure (36%) bei L. bulgaricus B₂ nach einer Fixierungszeit von 30 Minuten (Tab.5 (5e)) hängt möglicherweise mit der Glucosefütterung zusammen. Für das erhöhte Angebot an reduzierten Nicotinamid-adenin-nucleotiden funktiert die Oxalessigsäure ähnlich der Brenztraubensäure als H-Acceptor. Dieser Befund ist nicht ungewöhnlich, denn Lynch und Calvin (77) fanden bei L.casei, daß die Äpfelsäure in der löslichen Fraktion 90 % der Aktivität enthielt, während das Protein markierte Asparaginsäure aufwies.

Das Auftreten markierter Bernsteinsäure bei L. bulgaricus 1 und B₂ ist besonders deshalb überraschend, weil keine markierte Fumarsäure gefunden wurde. Zur Klärung der Herkunft des Succinats sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Bei den Fixierungsversuchen mit gewaschenen Zellen traten im Gegensatz zum Wachstum unter C¹⁴O₂ bei den Lactobazillen keine markierten Nucleotide auf.

Bei Lactobacillus casei (Tab.3 (2a,b)) konnte kein Einfluß der Glucose auf die C¹⁴O₂-Fixierung beobachtet werden. Dieser Organismus wurde bereits verschiedentlich untersucht. Gibbs et al. (93) hatten schon 1952 gefunden, daß ruhende Zellen kein C¹⁴O₂ einbauten. Lynch und Calvin (77) stellten fest, daß wachsende Zellen nach 16 Stunden nur eine Gesamtaktivität von 88 000 lpm aufwiesen, von denen 4 000 im unlöslichen Material festgelegt waren. Die Gründe für dieses indifferente Verhalten sehen die Verfasser in den schwer zu befriedigenden Nährstoffansprüchen.

Die Glucosegabe bewirkte bei Pediococcus cerevisiae (Tab.3 (6a,b)) ebenfalls keine Erhöhung der Gesamtfixierung. Von diesem strikt anaeroben Organismus ist bekannt, daß er bei völliger CO₂-Abwesenheit nicht wächst. Weinfurter, 1957, (94) verfolgte während des Wachstums den Einbau radioaktiven Kohlenstoffs in das Protein über einen Zeitraum von 8-136 Stunden. Die Hydrolysen ergaben, daß Asparagin- und Glutaminsäure, Lysin, Arginin und Serin markiert wurden. Im Gegensatz zu den Lactobazillen vermag die Biersarcina Glutaminsäure zu synthetisieren und erschließt sich damit eine Reihe weiterer Synthesewege im Stoffwechsel der Aminosäuren.

a_{2,2}. Streptococcus lactis und Sc. diacetylactis.

Die Glucosefütterung förderte bei Sc. lactis (Tab.4 (1b)) und Sc. diacetylactis (2b) die C¹⁴O₂-Fixierung im starken Maße. Enthielten die Proben von Sc. lactis noch zusätzlich organische Säuren als Substrat (1c,1d,1e), sanken die Gesamtfixierungen unter den Wert der Leerprobe (1a,kein exogenes Substrat) ab. Die Zitronen-, Brenztrauben- und Äpfelsäure bewirkten auch in Abwesenheit der Glucose eine Erniedrigung der Fixierungsraten (1f,g,h).

Um den Einfluß einer Verdünnung des C¹⁴O₂ durch C¹²O₂ beurteilen zu können, wurden die gleichen Substrate durch aliquote Mengen derselben Kultur vergoren und das freigesetzte CO₂ in regelmäßigen Abständen über zwei Stunden manometrisch im Warburg gemessen. In Tabelle 5 wurden die μ l CO₂ angegeben, die nach 40 Minuten gebildet worden waren. Sowohl bei der reinen Glucosefütterung (1b) als auch bei gleichzeitiger Gegenwart der Zitronensäure (1c) sowie bei reiner Zitronensäurefütterung (1f) war der CO₂-Anfall unerheblich. Er erreicht jedoch mit Glucose-Äpfelsäure (1e), mit Brenztraubensäure (1g) und Äpfelsäure (1h) als Substrat den fünffachen Wert gegenüber der Glucose; den zehnfachen sogar, wenn BTS und Glucose zusammen eingesetzt wurden.

Bei Zugabe von Äpfelsäure wurde deutlich, daß die C₃+C₁-Addition gehemmt werden kann, wenn C₄-Säuren als Substrat geboten werden. Dieser Effekt kann zwei Ursachen haben: Einmal die Verdünnung des C¹⁴O₂ durch das bei der Äpfelsäuregärung anfallende C¹²O₂, zum anderen die Erhöhung der Konzentration des Reaktionsproduktes. Ein Vergleich der Gesamtfixierungen zwischen Probe 1d (Tab.4) und 1e zeigt, daß neben der Verdünnung des C¹⁴O₂ auch die Hemmung der C₄-Synthese eine Rolle spielt. Die Zellen der Probe, die Glucose und Brenztraubensäure als Substrat enthielt, fixierten nämlich bei sehr viel höherem CO₂-Anfall mehr C¹⁴O₂ als jene, die Glucose und Äpfelsäure vergoren.

Im Fall der Brenztraubensäure (Tab.4 (1g)) hätte man eine ausgeprägte Förderung der C¹⁴O₂-Fixierung über die Pyruvat-Carboxylierung erwarten können, doch scheint hier ein erheblicher Verdünnungseffekt wirksam zu werden. Der hohe CO₂-Anfall ist insofern bemerkenswert, als normalerweise die bei der Glucosedissimilation gebildete Brenztraubensäure durch den homofermentativen Sc. lactis fast quantitativ in Milchsäure umgewandelt wird. Offensichtlich wird bei der Brenztraubensäurefütterung das Pyruvat unter Energiegewinnung zu Essigsäure und CO₂ decarboxyliert. Das dabei entstehende NADH kann durch die reich-

Nr.	Organismus	Zeit min	Subst.	% E	Gesamtfixg Ipm	Lösl. %	Unlös. %	ml CO ₂ 40 min
1a	Str.lactis	15	-	-	195 372	98	2.0	8.15
1b	"	"	Gluc.	0.1	366 938	96	4.0	35.70
1c	"	"	Gluc. Zit.	0.1 0.5	172 976	94	6.0	40.48
1d	"	"	Gluc. BTS	0.1 0.5	130 016	99	1.0	538.65
1e	"	"	Gluc. Äpf.	0.1 0.5	84 400	95	5.0	194.12
1f	"	"	Zit.	0.5	154 360	98	2.0	11.16
1g	"	"	BTS	0.5	176 120	99	1.0	172.50
1h	"	"	Äpf.	0.5	11 660	100	-	154.80
2a	Str.diacet- tilactis	"	-	-	13 260	100	-	-
2b	"	"	Gluc.	0.1	200 800	99	1.0	-

Tabelle 4. Gesamtfixierungen von $C^{14}O_2$ durch gewaschene Zellen von Streptococcus lactis und Sc. diacetylactis in Abhängigkeit vom Substrat. (Pro Probe 3 ml Zellsuspension/Phosphatpuffer: m/100, pH 6.2, 0.2 ml $NaHC^{14}O_3$ = 40 μ C. Gasphase: N_2 Abkürzungen: S.Tab.3)

lich vorhandene Brenztraubensäure unter Milchsäurebildung oxydiert werden.

Überraschend und schwer durchschaubar ist die Verdoppelung der CO_2 -Entwicklung, wenn neben dem Pyruvat auch Glucose als Substrat vorliegt.

Die Bestimmung der prozentualen Verteilung der markierten Produkte ergab, daß nach 15 Minuten über neunzig Prozent der Aktivität in der Asparaginsäure festgelegt waren, wenn die Säuren ohne Glucosezusatz in Gegenwart von $C^{14}O_2$ den Zellen angeboten wurden. (Tab.5, 1f,g) oder wenn den gewaschenen Zellen lediglich endogene Reservestoffe zur Verfügung standen. Der Prozentsatz an markierter Äpfelsäure war gering, stieg jedoch an, wenn die Zellen mit Glucose inkubiert wurden, die Versuchsansätze aber kein Malat als zusätzliches Substrat enthielten (Tab.4, 1b,c,d).

Die hohe $C^{14}O_2$ -Aufnahme bei der reinen Glucosefütterung hatte eine weitere Verteilung der Radioaktivität in Sekundärprodukte zur Folge. So wurden neben der Äpfelsäure und Asparaginsäure auch das Threonin und Methionin markiert (Tab.5, 1b, Abb.5). In dieser Probe gelangte das C^{14} zu 1.6 % auch in die Nucleotide. Das Citrullin war in allen

Nr.	Organismus	Subst.	Asp	Thre	Meth	Cit	Äpf	Zit?	Bern?	Nucl.	Son.
3a	L. bulg.1	-	78	-	-	-	7.3	-	4.6	-	4.6
3b	"	-	94	-	-	-	2.3	-	2.5	-	1.5
3c	"	-	88	-	-	-	1.5	-	7.2	-	2.6
5e	L. bulg.B ₂	Gluc.	48	-	-	-	36	-	16	-	-
1a	Str.lactis	-	95	-	-	-	3.8	0.24	-	-	0.88
1b	"	Gluc.	52	3.1	0.28	14	5.8	6.7	-	1.6	17
1c	"	Gluc.	63	-	-	11	8.5	5.0	-	-	13
1d	"	Zit.	64	-	-	7.9	11	6.0	-	-	11
1e	"	BTS	72	-	-	10	2.0	4.5	-	-	11
1f	"	Gluc.	97	-	-	-	3.0	-	-	-	-
1g	"	Äpf	94	-	-	-	3.4	1.3	-	-	1.1
2b	Str.diacet- tilactis	Gluc.	96	-	-	1.8	1.3	-	-	-	0.90

Tabelle 5. Prozentuale Verteilung der markierten Produkte der nicht-flüchtigen, löslichen Fraktionen von Lacto- bacillus bulgaricus 1 und B₂, Streptococcus lactis und Sc. di- acetilactis.

Fixierungsdauer: 3a,b,c = 1,3,10 min. 5e = 30 min (Vgl.Tab.3).

1a-1g,2b = 15 min (Vgl.Tab.4). Abkürzg. S.31

Proben, die Glucose als Substrat enthielten, mit durchschnittlich 10 % an der Gesamtaktivität beteiligt. Da die Synthese des Carbamyl- phosphats ATP erfordert, ist die fördernde Wirkung der Glucose in der vermehrten ATP-Bildung im Verlauf der Glykolyse zu suchen.

Wie auf Abbildung 5 (Chromatogramm von Sc. lactis) zu sehen ist, befinden sich unter der Äpfelsäure zwei unbekannte, stark radioaktiv markierte Substanzen. Die eine -mit v? bezeichnet - liegt ungefähr auf dem Platz der Zitronensäure, ihr prozentualer Anteil wurde in Tabelle 5 unter Zit? aufgeführt. Falls überhaupt vorhanden, ist der Gehalt an Zitronensäure nur gering. Möglicherweise enthält der Fleck Oxalessigsäure. Die andere Verbindung wurde auf der Abbildung als u? bezeichnet, ihr prozentualer Anteil erscheint in der Rubrik "Son.".

Bei Sc. diacetilactis waren nach 15 Minuten (Tab. 5, 2b) 98 % der Radioaktivität in der Asparaginsäure enthalten (Vgl.d.a.Abb.6).

b. Staphylococcus aureus.

Die Gesamtaktivität der flüchtigen Fraktionen war mit 1 % un= erheblich (Tab.6 , 2a). Die Glucosegaben (1c,d) führten gegenüber den Leerproben (1a,b) zu einem starken Absinken der $C^{14}O_2$ -Fixierungen.

Der prozentuale Anteil der Asparaginsäure bei den markierten Produkten der nicht-flüchtigen, löslichen Fraktionen betrug durchschnittlich 90 % (Tab.7). In die Äpfelsäure, Zitronen- und Glutaminsäure gelangte nur wenig Radioaktivität. Das Citrullin war in allen Proben nach fünf Minuten, das Arginin dagegen erst nach dreißig Minuten (1d,b) markiert.

Das Absinken der Gesamtfixierungen bei der Glucosefütterung beruht auf einer Verdünnung des $C^{14}O_2$ durch $C^{12}O_2$. Die Glucose bewirkte einen höheren Stoffumsatz gegenüber den Leerproben. Dies äußerte sich in einer Erhöhung des prozentualen Anteils der markierten Glutaminsäure (Tab.7, 1c,d).

Die geringe Verteilung der Radioaktivität ähnelt den Verhältnissen, die bei den Milchsäurebakterien gefunden wurden. Der einzige Unterschied besteht darin, daß die intakte Synthesekette über die Zitronen- und α -Ketoglutarinsäure die Bildung der Glutaminsäure erlaubt.

Neben der C_3+C_1 -Addition wird auch bei diesem Organismus $C^{14}O_2$ über Carbamylphosphat eingebaut, wie die Markierung des Citrullins und Arginins zeigen.

Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. Ipm	Lösl. %	Unlös. %
1a	5	169 302	99	1.0
1b	30	339 660	98	2.0
1c	5/+	95 880	96	4.0
1d	30/+	251 262	98	2.0
2a	10	3 225 558	99.00	
			F _n /%	F _s /%
			0.10	0.90

Tabelle 6.

Vers.Nr.	1a *	1b	1c	1d
Verbin- dungen	Inkubationszeit/min			
%	5	30	5/+	30/+
Asp	95	91	88	87
Glu	2.5	3.8	4.1	6.1
Glutn	0.52	0.30	1.1	0.24
Thre	-	1.3	-	0.94
Arg	-	0.32	-	0.36
Cit	1.4	2.5	1.5	2.9
Äpf	0.30	0.30	0.98	0.38
Zit	0.58	0.66	3.0	0.50
Sonst.	-	-	1.5	1.5

Tabelle 7.

Tabelle 6.

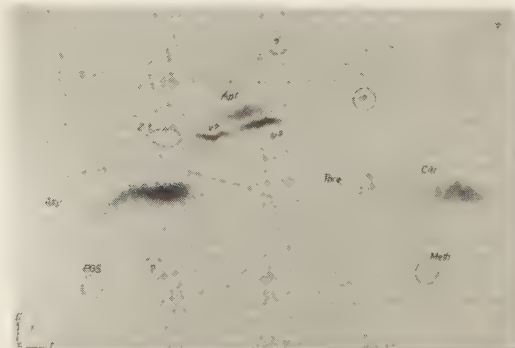
Gesamtfixierungen von C¹⁴O₂ durch gewaschene Zellen von Staphylo-
coccus aureus in Abhängigkeit von der Zeit.

1a-1d : Vier Proben einer Versuchsserie mit je 3 ml Zellsuspension
einer in 500 ml Nährmedium gewachsenen Kultur. Resuspension in
Phosphatpuffer : m/100, pH 6.2. Inkubation mit 0.2 ml m/100 NaHC¹⁴O₃
= 40 µC. Gasphase: Luft.

2a : 9 ml Zellsuspension. Inkubation mit 0.4 ml m/100 NaHC¹⁴O₃=80 µC.
/+ = Glucosezusatz (Endkonzentration = 0.1 %). Lösl.% = Prozentualer
Anteil der nicht-flüchtigen, löslichen Fraktion. Unlös.% = Prozentu-
aler Anteil der unlöslichen Zellbestandteile. F_s/% = Prozentualer An-
teil der flüchtigen Säuren an der Gesamtfixierung. F_n/% = Prozentu-
aler Anteil der flüchtigen Neutralstoffe an der Gesamtfixierung.

Tabelle 7.

Prozentuale Verteilung der markierten Produkte der nicht-flüchtigen,
löslichen Fraktionen bei Staphylococcus aureus. Abkürzg.=S.31.*Vgl.
Abb.7.



Laufmittel: I. Phenol-Wasser-EDTA-Essigsäure.
II. Butanol-Propionsäure-Wasser.

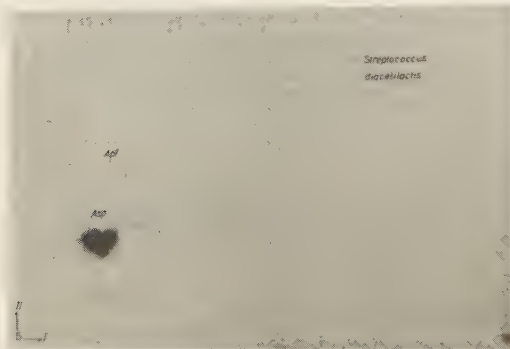


Abbildung 5.

$C^{14}O_2$ -Fixierung durch
Streptococcus lactis.

Fixierungszeit: 15 min.
Gasphase: Stickstoff.
Substrat: Glucose (0.1% E).

Autoradiogramm eines zwei-dimensionalen Chromatogramms der Probe 1b (Tab.5)

Verteilung der löslichen, C^{14} -markierten Produkte.

Abkzg. = S.31.
v?, u? = S.a.S.39.

Abbildung 6. Wie Abb.5.

Streptococcus diacetylactis.
(Tab.5, Probe 2b).

Abbildung 7. Wie Abb.5.

Staphylococcus aureus.

Fixierungszeit: 30 min.
Gasphase: Luft.
Substrat: -

(Tab.7, Probe 1b).

2. Organismen mit überwiegender Fixierung des $C^{14}O_2$ in Asparagin- und Zitronensäure als Folgeprodukte der primär gebildeten Oxal-essigsäure. Ausgeprägte Verteilung der Radioaktivität in Sekundärprodukten.

<i>Pseudomonas pyocyanea</i>	(Pseudomonadaceae).
<i>Sarcina flava</i>	(Micrococcaceae).
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	
<i>Flavobacterium spec.</i>	(Achromobacteriaceae).

Bei beiden Vertretern der Micrococcaceae enthielten die leichtflüchtigen Fraktionen (Tab.9,10 (1a,1a)) nur einen unbedeutenden Prozentsatz an Radioaktivität, während bei *Pseudomonas pyocyanea* die Fraktion der leichtflüchtigen Säuren mit 8.8 % (Tab.8, F_s) und bei *Flavobacterium spec.* mit 16 % (Tab.12, F_s) einen bemerkenswerten Teil der Gesamtfixierung ausmachte. Die Chromatographie des Flüchtigen ergab für *Ps. pyocyanea* eine fast ausschließliche Markierung der Ameisensäure. Die entsprechende Bestimmung für *F.spec.* scheiterte an der zu geringen Aktivität jener Extraktmenge, die chromatographisch noch trennbar gewesen wäre.

Abgesehen von den zu niedrigen Werten der Fixierung nach 3 und 10 Minuten bei *F.spec.* bauten alle vier Organismen in Abhängigkeit von der Zeit zunehmend C^{14} in Zellsubstanzen ein (Tab. 8,9,11,12). Eine der Zeit direkt proportionale $C^{14}O_2$ -Aufnahme war nicht zu erwarten, da die besonders bei Glucosegaben auftretende Verdünnung des $C^{14}O_2$ durch Atmungs- $C^{14}O_2$ und die wachsende Verarmung der gewaschenen Zellen an körpereigenen Reservestoffen zu einem Abfall der Fixierungsraten führen.

Wie bereits beschrieben (s.S.18), wurden die Proben für die $C^{14}O_2$ -Fixierung gleichzeitig vorbereitet. Zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang, daß die Zugabe des $NaHC^{14}O_3$ bei den Versuchsansätzen mit den längsten Fixierungszeiten zuerst, bei denen mit den kürzesten zuletzt erfolgte. Von Probe zu Probe betrug die zeitliche Verzögerung in der Regel nicht mehr als fünfzehn Sekunden. In der umgekehrten Reihenfolge wurden dann die Zellsuspensionen mit Alkohol abgetötet.

Die Glucosefütterung bewirkte bei *Ps. pyocyanea* (Tab.8,(2c)) und bei *S. flava* (Tab.9,(2b,3c)) eine deutliche Erhöhung der $C^{14}O_2$ -Aufnahme.

Im extrahierten, unlöslichen Zellmaterial waren bei *Ps. pyocyanea* (Tab.8,(2f)) und bei *F.spec.* (Tab.12 (2f)) nach 30 Minuten 51 % bzw.

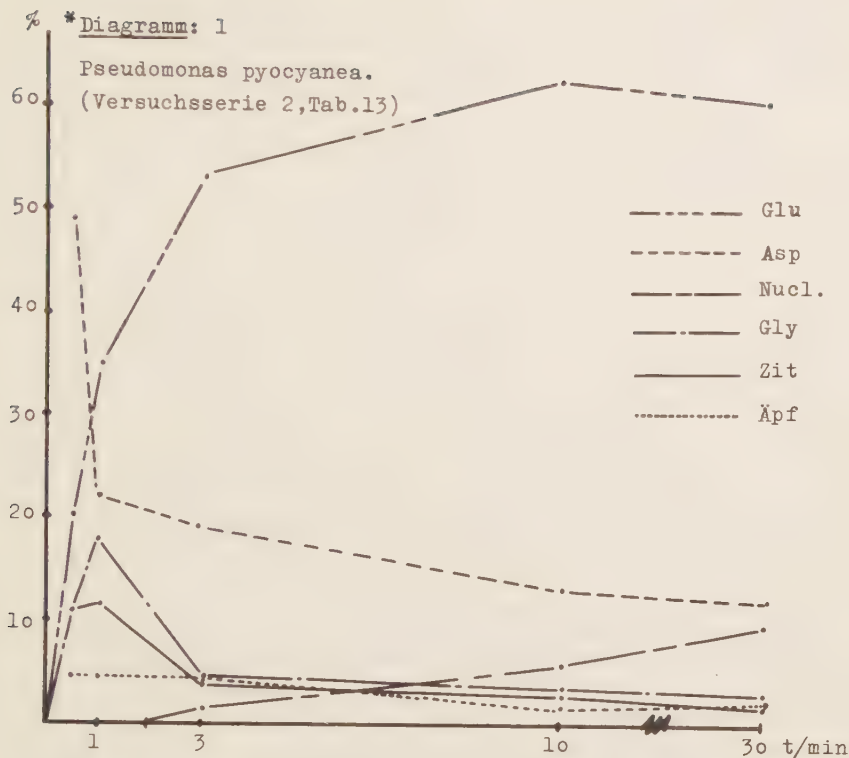
49 % der Gesamtaktivität enthalten, bei M.lysodeikticus (Tab.11 (2d)) nach 40 Minuten 31 %. Der prozentuale Anteil des Rückstandes betrug bei S.flava (Tab.9) nach 1 Minute (2a) 21 % und sank dann im Verlauf von 30 Minuten auf 10 % ab (2b-e).

Daß bei einigen Organismen der prozentuale Anteil der unlöslichen Fraktion an der Gesamtaktivität in Abhängigkeit von der Zeit steigt, während er bei anderen schon zu Beginn der Versuchszeit seinen höchsten Wert erreicht und dann fällt, ist verständlich, wenn man berücksichtigt, daß eine zusätzliche Stickstoffquelle nicht geboten wurde. Das Wachstum und damit der Einbau radioaktiven Kohlenstoffs in das unlösliche Protein und die Nucleinsäuren hing also von der Menge des endogen verfügbaren Stickstoffs ab.

Die prozentuale Verteilung aller markierten Produkte der nicht-flüchtigen, löslichen Fraktionen und Hydrolysate des Unlöslichen wurde in Tabellen aufgeführt. Um die wechselseitigen Beziehungen zwischen den wichtigsten primären und sekundären Fixierungsprodukten deutlicher herauszustellen, wurde der prozentuale Anteil dieser Substanzen in Abhängigkeit von der Zeit graphisch dargestellt.

Bei allen 4 Organismen zeigten die Diagramme 1., 2., 3 und 4 Übereinstimmend, daß bei der Asparagin- und Zitronensäure die teilweise hohen Anfangswerte mit zunehmender Fixierungsdauer mehr oder minder stark abnehmen. Demgegenüber liegen die Werte der Äpfelsäure fast alle unter 5 % und weisen vergleichsweise geringe Veränderungen auf. Auffällig ist der krasse Anstieg der Glutaminsäurekurven und der anfangs erstaunlich hohe Anteil des Glykokolls. Bei Ps.pyocyanea (Diagramm 1) steigt er von 11 % nach 30 Sekunden auf 18 % nach 1 Minute, bevor er im Verlauf von 30 Minuten auf 2.7 % abfällt. Bei M. lysodeikticus (Diagramm 3) beträgt er nach 1 Minute 12 % und bei S. flava sogar 34 % (Diagramm 2, Abb.8). Bei letzterem wird die starke Zunahme an radioaktiver Glutaminsäure innerhalb der ersten drei Minuten von einem Absinken des prozentualen Anteils der Zitronensäure um die Hälfte (Tab.14 (2a,c)(13 % - 6.3 %)) und des Glykokolls auf ein Drittel (34 % - 9.5 %) begleitet. Die Asparaginsäure wurde von diesen Veränderungen vorerst nicht betroffen. Bei F. spec. (Diagramm 4) weist das Glykokoll mit 22-23 % über 10 Minuten einen konstanten Wert auf (vgl. d.a.Abb.9).

Die Summe der Nucleotide war bei F. spec. mit 17 % nach 1 Minute und 71 % nach 30 Minuten beträchtlich, überstieg dagegen bei Ps. pyocyanea und den Mikrokokken nie 10 %.



Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. Ipm	Lösl. %	Unlösl. %	F _n /%	F _s /%
1a	10	678 492	89.00		2.2	8.8
2a	0.50	64 480	90	10		
2b	1	64 070	88	12		
2c	1/+	341 620	91	9.0		
2d	3	204 544	79	21		
2e	10	464 508	61	39		
2f	30	796 250	49	51		

Tabelle 8.

Wie Tab.6

*Pseudomonas
pyocyanea.*

* Diagramm: Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der wichtigsten Fixierungsprodukte in Abhängigkeit von der Zeit bei *Pseudomonas pyocyanea*. (Die Werte sind der Versuchsserie 2 in Tab.13 entnommen).

% Diagramm 2.

Wie Diagr.1.

Sarcina flava.

(Vers.2,Tab.14)



Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. Ipm	Lösl. %	Unlös. %	F _n /%	F _s /%
1a	10/+	2 096 316	98.40		0.30	1.30
2a	1	19 312	79	21		
2b	1/+	38 252	91	9.0		
2c	3	21 736	88	12		
2e	10	167 608	95	5.0		
2d	30	509 280	90	10		
3a	30	300 000	82	18		
3b	5/+	221 190	91	9.0		
3c	30/+	476 710	85	15		
4a	0.25/+	19 828	94	6.0		
4b	0.50/+	65 280	94	6.0		
4c	3	114 248	95	5.0		
5a	10/+	684 790	88	12		
5b	40/+	1 282 890	84	16		

Tabelle 9.

Wie Tab.6

Sarcina flava.

Tabelle 10. Sarcina flava.

Hydrolysate des Unlöslichen.
(6n HCl, 36 h, 110°C, N₂)

Prozentuale Verteilung der C¹⁴-markierten Produkte in Abhängigkeit von der Fixierungszeit.

Tabelle 10.

Verbindungen	Nr.	5a	5b
	Zeit	10/+	40/+
Asp		32	24
Glu		37	26
Lys		23	35
Uracil		8.5	15

Diagramm 3.

Wie Diagr.1

Micrococcus lysodeikticus.

(Versuchsserie 2/Tab.15)



Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. Ipm	Lösl. %	Unlös. %	F _n /%	F _s /%
1a	10	1 005 788	96.70		1.6	1.7
1b	0.25	39 732	90	10		
1c	0.50	64 422	95	5.0		
2a	1	8 008	97	3.0		
2b	3	20 216	93	7.0		
2c	10	23 674	89	11		
2d	40	254 016	69	31		
3a	5/+	57 990	78	22		
3b	30/+	66 120	79	21		

Tabelle 11.

Wie Tab.6

Micrococcus
lysodeikticus.

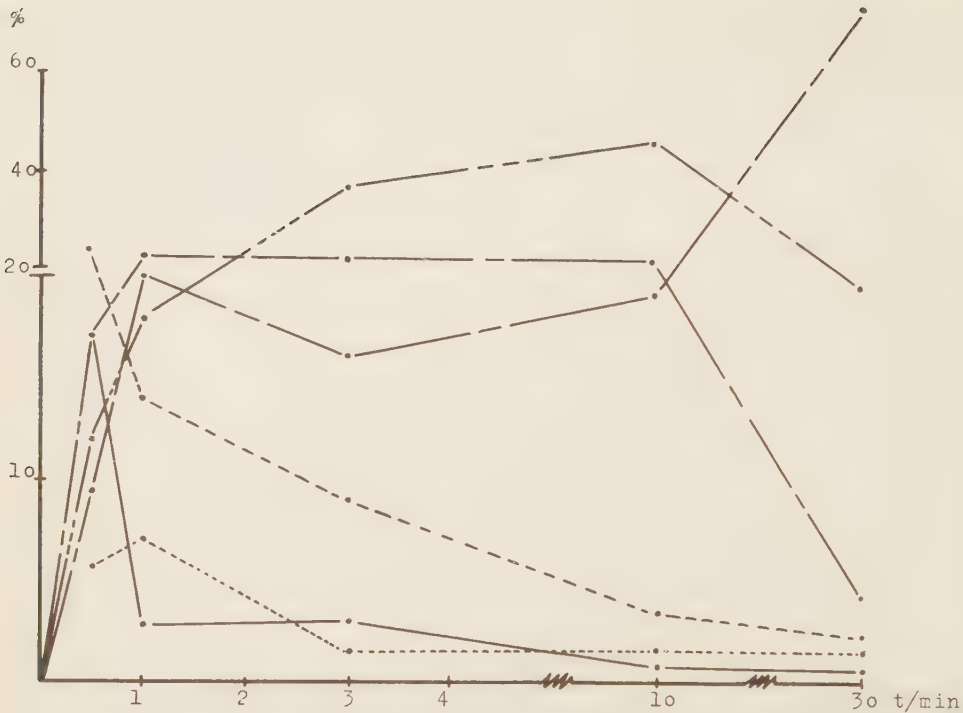


Diagramm 4.

Wie Diagr.1

Flavobacterium spec.

(Versuchss.2/Tab.16)

— — — — — Nucl. Äpf
 — — — — — Glu Asp
 — · — · — Gly — — — — Zit

Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. Ipm	Lösl. %	Unlös. %	F _n /%	F _s /%
1a	10	160 818	82.00		2.0	16
2a	0.50	233 160	97	3.0	<u>Tabelle 12.</u> Wie Tab.6 Flavobacterium spec.	
2b	1	588 708	93	7.0		
2c	1/+	426 076	93	7.0		
2d	3	493 776	86	14		
2e	10	277 720	63	37		
2f	30	761 280	51	49		

War der prozentuale Anteil der Nucleotide nur gering, wurde er in den Tabellen häufig unter "Nucl." vermerkt. In den meisten Fällen erfolgte die nachstehende Aufschlüsselung: Mischfleck "1" : Nucleosidtriphosphate, Mischfleck "2" : Uridindiphosphat-Glucose (UDPG) o.ä., Mischfleck "3" : Nucleosidiphosphate. ATP, ADP und AMP erscheinen in den Tabellen unter "AMP !!!". (Vgl.d.Abb.3, S.26).

Bei F. spec. wurden die Produkte des Mischfleckes 3 aus den Chromatogrammen eluiert, gesammelt und enzymatisch gespalten (vgl.d.Meth. S.28). Die Radioaktivität verteilte sich wie folgt (s.d.Abb. 10):

Uridin	:	78.0 %
Uracil	:	8.4 %
UMP	:	3.2 %
Glyzerins're	:	2.6 %
Gluconsäure?	:	8.0 %

wie aus Tabelle 13 ersichtlich ist, wurden bei Ps. pyocyanea auch markierte Phosphorglyzerinsäure, Glyzerin- und α -Ketoglutarsäure gefunden. Von den Aminosäuren enthielten ferner Alanin, Citrullin und DAP C¹⁴. Die Glucosefütterung verursachte auf Kosten des Zitronensäure- und Glykokollanteiles eine Zunahme an markierter Glutaminsäure (2c), wenn man die Werte der entsprechenden Leerprobe (2b) zum Vergleich heranzieht. Die Asparagin- und Äpfelsäure bleiben mit 22 % bzw. 5.2 % (4.7 % = Leerprobe) konstant.

Bei S. flava (Tab.14) erhöhte sich der Glutaminsäureanteil ebenfalls beträchtlich, wenn Glucose als Substrat gegeben wurde (2b,(2a)). Eine erhebliche Abnahme verzeichnen auch hier die Prozentsätze der Zitronensäure und des Glykokolls, während die Asparaginsäure von 14 % auf 17 % zunimmt.

Die Glucosefütterung führte bei den Proben 3b und 3c einer zweiten Versuchsserie vor allem zu einer vermehrten Bildung des Citrullins und der Nucleotide. Außerdem traten markierte Fumar- und Bernsteinsäure auf. Eine dritte Versuchsserie mit Glucosezusatz (4a-c) zeigte nach 15 Sekunden einen hohen Einbau von C¹⁴ in das Glykokoll (53 %). Die Glutaminsäure wurde dagegen nur wenig markiert.

Bei M. lysodeikticus wurde die Ergebnisse der Versuchsserie 2 im Diagramm 3 dargestellt. In einem zweiten Fixierungsversuch über 15 und 30 Sekunden (Tab.15 (1b,c) war nicht die Asparaginsäure als primäres Folgeprodukt der Oxalessigsäure markiert, sondern die Zitronensäure mit 78 % bzw. 65 %.

Vers.Nr.	2a	2b*	2d	2e	2f	2c	2b/a	2e	2f	
Verbindungen	Inkubationszeit / min						Hy	Hy	Hy	
	%	0.50	1	3	10	30	1/+	1/3	10	30
Asp	49	22	19	13	12	22	81	51	43	
Glu	15	27	44	53	56	39	19	14	17	
Glutn*	5.5	8.0	10	11	6.1	6.2	-	-	-	
Gly	11	18	4.9	3.6	2.7	8.6	-	7.0	8.0	
Thre	-	-	-	-	-	-	-	5.6	3.6	
Ala	2.2	2.6	4.9	-	-	1.2	-	-	-	
DAP	1.4	2.4	3.0	3.5	4.3	3.0	-	11	17	
Meth	-	-	-	-	-	-	-	1.7	2.6	
Leu	-	-	-	-	-	-	-	5.4	5.6	
Val	-	-	-	-	-	-	-	1.0	1.3	
Äpf	4.9	4.9	4.5	1.9	2.9	5.2	-	Cyst		
Zit	11	12	3.3	3.0	1.4	3.0	-	2.7	1.7	
α-KGS	-	1.1	1.4	0.84	1.6	0.89	-	-	-	
Glyzs	-	-	-	1.3	-	-	-	-	-	
PGS	-	2.4	1.7	1.2	1.1	1.9	-	-	-	
1	-	-	1.6	3.0	1.2	0.85	-	-	-	
2	-	-	-	-	2.2	-	-	-	-	
3	-	-	-	0.94	2.1	0.96	-	-	-	
MN†	-	-	-	1.9	4.1	-	-	-	-	
Sonst.	-	-	1.7	1.8	2.3	7.2 ⁺	-	-	-	

Tabelle 13. Wie Tab.7 *Pseudomonas pyocyanea*.

* = Enthält 10-20 % Citrullin.

† = U.a.Val,Leu,Glyks.

* = S.d.a.Abb.9

Hy= Hydrolysate des Unlöslichen.
(Wie Tab.10)

Vers.Nr.	2a	2c	2d	2e	3a	2b	3b	3c	4a*	4b	4c
Verbindungen %	Inkubationszeit / min										
	1	3	10	30	30	1/+	5/+	30/+	⁺ 0.25	⁺ 0.50	3/+
Asp	13	14	8.7	4.0	5.4	17	1.3	0.93	16	15	36
Aspn	-	-	-	-	-	-	4.3	2.4	-	-	-
Glu	27	66	76	76	67	44	57	38	6.0	11	12
Glutn	1.7	-	0.70	6.1	1.8	1.3	5.4	15	-	-	-
Gly	34	9.5	6.5	2.8	2.4	17	0.66	0.25	53	62	33
Cit	-	-	0.64	2.6	1.4	1.5	7.3	11	-	-	-
Thre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.5
Ala	-	-	-	-	-	-	-	2.1	-	-	-
Meth	-	-	-	-	-	-	-	0.41	-	-	-
Äpf	2.6	2.9	0.92	0.63	2.9	2.9	2.3	3.8	6.5	1.5	-
Fum	-	-	-	-	-	-	0.51	0.64	-	-	-
Bern	-	-	-	-	-	-	1.3	2.4	-	-	-
Zit	13	6.3	1.4	0.36	0.59	5.1	5.6	1.9	9.0	3.5	8.0
Glyzs	3.0	1.0	0.60	0.38	0.25	1.2	0.69	0.20	1.6	2.2	1.5
Glyks	-	-	-	-	-	-	-	-	1.4	3.4	-
BTS	2.0	1.0	0.71	-	-	0.82	0.49	-	3.4	-	-
PGS	3.7	-	-	0.30	1.9	4.3	-	-	-	-	-
1	-	-	1.6	2.6	2.5	4.2	1.2	-	-	-	-
2	-	-	1.1	1.5	2.3	-	1.5	2.6	-	-	-
3	-	-	-	-	1.8	-	5.2	7.6	-	-	-
UMP	-	-	-	-	0.65	-	1.1	0.70	-	-	-
AMP !!!	-	-	1.1	0.41	2.3	-	1.4	2.8	-	-	-
GP?	-	-	-	-	-	-	-	4.3	3.0	1.4	4.0
NADP	-	-	-	-	-	-	-	0.69	-	-	-
Sonst.	-	-	-	2.3	6.8	0.70	2.7	2.2	-	-	4.0

Tabelle 14. Wie Tab.7 *Sarcina flava*. * = Abb.8

Vers.Nr.	1b	1c	2a	2b	2c	2d	3a	3b
Verbindungen %	Inkubationszeit/min							
	0.25	0.50	1	3	10	40	5/+	30/+
Asp	7.0	9.2	39	29	30	7.2	5.7	2.9
Aspn	-	-	-	-	-	2.0	4.4	3.3
Glu	5.8	8.6	29	55	52	35	70	54
Glutn	-	-	-	-	7.6	31	4.8	7.2
Gly	6.3	11	12	2.5	-	2.0	-	-
Cit	-	-	-	-	-	4.3	3.0	7.8
Äpf	3.4	4.3	3.5	1.5	2.5	3.2	3.9	4.8
Zit	78	65	15	6.3	3.0	2.0	3.6	2.7
Glyzs	-	-	-	0.44	2.2	0.46	-	-
Glyks	-	-	-	-	-	1.1	-	-
PGS	-	-	-	2.4	-	1.4	-	-
PEB	-	-	-	1.8	-	1.2	-	-
Nucl.	-	-	-	-	-	7.8	2.5	11
Sonst.	-	1.4	1.5	1.1	2.7	1.4	2.3	5.7

Tabelle 15. Wie Tab.7. *Micrococcus lysodeikticus*.

Die chromatographische Auftrennung der Hydrolysate der unlöslichen Fraktionen von *Ps. pyocyanea* (Tab.13 (Hy. b-f)), *S. flava* (Tab.10) und *F. spec.* (Tab.16, Hy. d-f) ergab, daß vor allem die Asparagin- und Glutaminsäure markiert waren. Gleichzeitig oder in Abhängigkeit erschienen dann u.a. eine Reihe weiterer Aminosäuren, deren Synthese sich von diesen ableitet. So wurden bei *F. spec.* Methionin, Threonin und Prolin gefunden, bei *S. flava* Lysin und bei *Ps. pyocyanea* Diaminopimelinsäure (DAP), Methionin, Threonin und Cystein. Bei letzterem enthielt zudem das Protein noch radioaktives Glykokoll, Valin und Leucin. An dieser Stelle sei vermerkt, daß die Identifizierung des Methionins dadurch sehr erschwert wurde, daß es im Vergleich zum Testchromatogramm auf einem untypischen Platz lag und erst rechromatographiert werden mußte (vgl.d.Abb.11).

Vers.Nr.	2a	2c [•]	2d	2e	2f	2b	2d	2e	2f ⁺
Verbindungen *	Inkubationszeit / min						Hy	Hy	Hy
	0.50	1	3	10	30	1/+	3	10	30
Asp	25	14	9.0	3.3	2.3	15	53	57	34
Glu	12	18	36	43	18	18	9.6	9.9	12
Glutn	-	-	1.4	1.5	1.0	0.63	-	-	-
Gly	17	23	23	22	4.2	18	-	-	-
Ala	-	-	-	1.5	0.74	-	-	-	-
Cit	12	8.4	4.6	2.4	0.46	11	-	-	-
Arg	-	-	1.9	2.3	-	-	-	-	-
Thre	-	-	-	-	-	-	-	-	2.0
Pro	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0
Meth	-	-	-	-	-	-	29	26	36
Äpf	5.7	7.1	1.4	1.7	1.4	5.9	-	-	-
Fum	-	1.3	-	-	-	-	-	-	-
Bern	0.82	3.7	2.7	-	-	-	-	-	-
Zit	17	2.9	3.1	0.95	0.56	11	-	-	-
Glyzs	-	-	-	0.83	0.51	-	-	-	-
BTS	0.97	1.4	0.49	-	-	1.1	-	-	-
1	1.6	2.9	3.2	5.7	13	5.1	-	-	-
2	2.2	7.2	5.5	5.9	34	7.3	-	-	-
3	1.1	3.3	4.2	5.4	15	3.7	-	-	-
UMP [•]	4.5	5.2	2.6	1.5	4.0	4.1	-	-	-
AMP ^{!!!}	0.97	0.82	1.3	1.2	2.5	-	-	-	-
Uracil	-	-	-	-	-	-	9.2	7.1	10
Adenin	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0
Guanin	-	-	-	-	-	-	-	-	2.0
Sonst.	-	0.80	-	0.80	2.3	-	-	-	2.0 ⁺

Tabelle 16. Wie Tab.7. Flavobacterium spec.

* = Abb.11 • = Enthält GMP. + = Enthält etwas

• = Abb. 9 DAP und UV-absorbierender Substanzen.

Durch die Hydrolyse wurden ferner markierte Basen aus der Desoxy-ribonucleinsäure und Ribonucleinsäure freigesetzt. Bei S. flava wurde Uracil und bei F. spec. Uracil, Adenin und Guanin gefunden. Auf den Chromatogrammen liegen Uracil und Valin bzw. Adenin und Leucin (Isoleucin) fast deckungsgleich. (S.d.Abb. 11). Diese Substanzen konnten in anderen Laufmitteln getrennt und durch Cochromatographie eindeutig identifiziert werden. Radioaktives Uracil war in den Nucleinsäuren aller untersuchten unlöslichen Fraktionen der Bakterien und Pilze enthalten. Es wurde aus den Chromatogrammen verschiedener Organismen durch Elution gewonnen und gemeinsam abgebaut. Es ergab sich folgende Verteilung der Radioaktivität innerhalb des Moleküls:

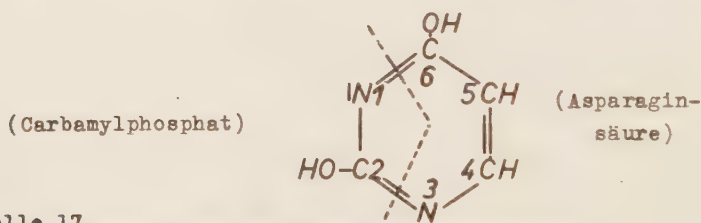


Tabelle 17.

	Total- oxydat.	C ₄ -C ₅ C ₅ -C ₆	C ₂
Spez. Akt. Ipm	503	593	1 497
Prozent. Verteil'g des C ¹⁴	-	23.50	76.50

Diskussion.

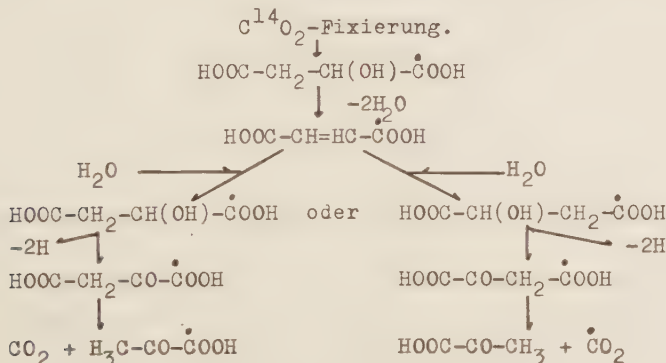
Die mit zunehmender Fixierungszeit prozentual starke Abnahme der Asparagin- und Zitronensäure bei Ps. pyocyanea, S. flava, M. lyso-
deicticus und F. spec. ist für "primäre" Fixierungsprodukte charak-
teristisch. Bei der Äpfelsäure deuten dagegen die nach kurzen Zeiten
sehr niedrigen, nur zögernd abnehmenden Prozentsätze darauf hin, daß
es sich hier um ein sekundäres Fixierungsprodukt handelt. Die C₃+C₁-
Addition führt demnach hier vorwiegend zur Bildung freier Oxalessig-
säure, die entweder zu Asparaginsäure aminiert oder mit Acetyl-CoA
zu Zitronensäure kondensiert wird. Welche der beiden Reaktionen über-

wiegt, hängt von der Lage der Stoffwechselgleichgewichte ab, wie die unterschiedlichen Ergebnisse bei M. lysodeikticus zeigen.

Bei M. lysodeikticus stimmen die Ergebnisse sehr gut mit den Befunden überein, die McManus, 1951, (95) beim gleichen Organismus erhielt. Die Verfasserin arbeitete mit Extrakten lysierter Zellen und fand im Verlauf der Kohlendioxydfixierung einen höheren Einbau von $C^{14}O_2$ in Oxalessigsäure als in Malat. Die Zugabe von NADP bzw. NADPH führte zu keiner wesentlichen Verschiebung, was die Teilnahme des Malic-NADP-Enzymsystems als CO_2 -Fixierungsmechanismus ausschließt. Adenosintriphosphat bewirkte ebenfalls keinen merklichen Anstieg der Fixierungsrate. Eine C_3+C_1 -Addition über die PEB-Carboxylase ist damit wahrscheinlich.

Die schnell ansteigende, hohe Markierung der Glutaminsäure läßt einen gut funktionierenden Zitronensäurezyklus vermuten. Er konnte von Prince und Cleverdon, 1955, (96) anhand enzymchemischer Untersuchungen in *Flavobacterium aquatile* nachgewiesen werden. Barret und Kallio, 1953, (97) fanden Enzyme des Tricarbonsäurezyklus in den zellfreien Extrakten von *Pseudomonas fluorescens*. Die Verfasser nehmen allerdings an, daß es sich um adaptive Fermente handeln könnte.

Das Auftreten radioaktiven Alanins, sowie markierter PGS, Glycerin- und Brenztraubensäure erklärt sich zwanglos aus der Tatsache, daß einmal ein unmittelbarer Austausch des $C^{14}O_2$ mit der Carboxylgruppe des Pyruvats stattfinden kann und daß zum anderen Aktivität über die reversible Fumarase-Reaktion gemäß nachstehendem Schema in die α -Carboxylgruppe der Oxalessigsäure gelangt. Diese spaltet dann zu BTS und CO_2 .



Die Bildung radioaktiven Glykokolls kann sowohl über Serin aus Phosphohydroxybrenztraubensäure, wobei die markierte Carboxylgruppe des Pyruvats erhalten bleibt, als auch über den Glyoxylat-Shunt erfolgen. Bei der Isocitritase-Spaltung entsteht carboxylmarkierte Glyoxylsäure und unmarkierte Bernsteinsäure, wenn die mit Acetyl-CoA kondensierende Oxalessigsäure lediglich in der β -Carboxylgruppe Radioaktivität enthielt. Sind dagegen beide Carboxylgruppen markiert, enthält auch das Succinat C^{14} .

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß auch über den Zitronensäurezyklus Bernsteinsäure gebildet wird, die jedoch immer unmarkiert ist, gleichgültig ob die Oxalessigsäure nur in der β - oder auch in der α -Carboxylgruppe markiert ist. Bei der Umwandlung der Isozitronensäure in Oxalbernsteinsäure wird nämlich die α -Carboxylgruppe des "Oxalessigsäureteils" abgespalten, bei der Decarboxylierung der α -Ketoglutarsäure die β -Carboxylgruppe.

Die bei der $C_4 + C_2$ -Spaltung entstehende Glyoxylsäure kann sich entweder über die Malat-Synthetase mit Acetyl-CoA zu Äpfelsäure verbinden oder durch Reduktion in Glykolsäure bzw. Aminierung in Glykokoll verwandeln.

Der Glyoxylat-Zyklus wurde durch die Arbeitskreise um Kornberg und Krebs, 1957, (98), Wong und Ajl, 1957, (99) endgültig aufgeklärt und formuliert. Die Bilanz der Einzelreaktionen entspricht der lange Jahre hindurch diskutierten Bernsteinsäurebildung über eine C_2 -Körper-Kondensation. Die Zweifel an der Existenz einer Acetat-Kondensation im Sinne Thunbergs (3) hatten sich als begründet herausgestellt. Umstritten ist die Frage, ob der Glyoxylat-Shunt, der über wichtige Schritte des Zitronensäurezyklus verläuft und daher auch Glyoxylat-Bypass genannt wird, unter normalen Lebens- und Ernährungsbedingungen in der Zelle eine Bedeutung hat. In Pseudomonaden, einigen Stämmen von Escherichia coli und verschiedenen Schimmelpilzen, die auf C_2 -Verbindungen zu wachsen vermögen, erscheint seine Funktion sinnvoll, da nur dadurch die Synthese der wichtigen C_4 -Verbindungen gewährleistet ist. Die genannten Organismen dienen in einer Vielzahl von Untersuchungen als Objekte. Bereits 1953 hatten Campbell et al. (100) bei Pseudomonas aeruginosa die wichtige Beobachtung gemacht, daß aus Zitronen- und Isozitronensäure Glyoxyl- und Bernsteinsäure gebildet werden. Das beteiligte Enzym, die Isocitritase, wurde von Smith und Gunsalus (101) gereinigt und in seinen Eigenschaften bestimmt. Die Malat-Synthetase wurde von Wong und Ajl, 1956, (102) in Zellen von Escherichia coli nachgewiesen, die auf Acetat gewachsen waren. Unter

gleichen Bedingungen gelang es Kornberg und Madsen, 1957, (103) beide Enzyme in Zellextrakten von *Pseudomonas* nachzuweisen. Über das Vorkommen des intakten Glyoxylat-Zyklus oder einiger der charakteristischen Reaktionen in anderen Organismen ist wenig bekannt.

Daß bei den hier untersuchten Organismen die Bildung des Glykokolls über den Glyoxylat-Shunt verläuft, geht aus folgenden Beobachtungen hervor:

1. Die Markierung der C_3 -Verbindungen fällt prozentual kaum ins Gewicht, zudem läßt sich häufig nach kurzen Fixierungszeiten keine Aktivität in diesen Produkten nachweisen. Markiertes Serin, das durch die Aminierung der 3-Phosphohydroxybrenztraubensäure entsteht und das Ausgangsprodukt für die am weitesten verbreitete Glykokollsynthese bildet, tritt anfangs überhaupt nicht und später nur zu einem geringen Prozentsatz auf. Es wurde z.B. bei F. spec. erst nach einer Fixierungszeit von 10 Minuten auf den Chromatogrammen gefunden.

2. Der prozentuale Anteil des Glykokolls an der Gesamtfixierung zeigte bei Ps. pyocyanea und F. spec. nach 1 Minute, bei S. flava bereits nach 30 Sekunden ein Maximum. Dies ist für frühe Sekundärprodukte charakteristisch. Im gleichen Zeitraum wird auch die Glutaminsäure zunehmend markiert, während die Prozentsätze der primären Folgeprodukte der Oxalessigsäure, Asparagin- und Zitronensäure abnehmen. Der Materialfluß über die Isozitronensäure speist also offensichtlich sowohl die Isocitritase-Reaktion (C_4+C_2 -Spaltung) als auch die Isocitric-Dehydrogenase-Reaktion, die ein Teilschritt des Zitronensäurezyklus ist.

Bei S. flava (Tab.14) wird in der einen Versuchsserie (4) überwiegend Glykokoll gebildet, in der anderen (2) nimmt dessen Prozentsatz rasch zugunsten der Glutaminsäure ab. Augenscheinlich ist die Alternative zwischen zwei Stoffwechselwegen von schwer reproduzierbaren Bedingungen abhängig.

Neben der Glykokollsynthese wird vermutlich über den Glyoxylat-Bypass durch die Malat-Synthetase-Reaktion Äpfelsäure gebildet, deren Prozentsätze anfangs konstant bleiben oder wie bei F. spec. (Tab.16) sogar leicht ansteigen. Würde das Malat nur durch die Reduktion der Oxalessigsäure entstehen, müßte es wie die anderen primären Folgeprodukte derselben im Verlauf der Fixierungszeit prozentual abnehmen.

Die bei der Spaltung der Isozitronensäure gleichzeitig entstehende Bernsteinsäure ist bei den hier behandelten Organismen fast immer unmarkiert. Wie bereits erwähnt, ist dies nur dann der Fall, wenn die Oxalessigsäure ausschließlich in der β -Carboxylgruppe Aktivität ent-

hielt. Daß dies hier zutrifft, wird dadurch wahrscheinlich gemacht, daß die beim Austausch der α - und β -Carboxylgruppe als Zwischenprodukt auftretende Fumarsäure in den meisten Proben nicht meßbar aktiv war.

Bei der Hydrolyse des Proteins bestätigte vor allem das Auftreten markierter Asparaginsäure den Einbau des C^{14} über die C_3+C_1 -Addition. Ungewöhnlich hoch war der prozentuale Anteil radioaktiven Methionins bei F.spec. Die relativ stark markierten "sekundären" Aminosäuren traten auf den Chromatogrammen der löslichen Fraktionen oftmals wenig oder gar nicht auf. Daß bei Ps.pyocyanea markierte Diaminopimelinsäure und bei S. flava stattdessen Lysin auftritt, steht im Einklang mit den heute bekannten Zellwandzusammensetzungen.

Der besonders bei F.spec. hohe prozentuale Anteil an markierten Nucleotiden in den löslichen Fraktionen ließ den Einbau von C^{14} in die Nucleinsäuren erwarten. Da das Purin und Pyrimidin unter den gegebenen Hydrolysebedingungen eine recht verschiedene Stabilität aufweisen (104), entspricht der krasse prozentuale Unterschied in der Aktivitätsverteilung zwischen Adenin und Uracil sicherlich nicht den Tatsachen. Um ein unverfälschtes Bild zu erhalten, wurde z.B. bei Corynebacterium nephridii (S.64) versucht, die im Rückstand vorliegende DNS und RNS enzymatisch zu spalten und unabhängig von der Proteinfraktion zu analysieren (vgl. Meth.S.22). Das prozentuale Verhältnis zwischen den beiden Basen konnte nicht genau ermittelt werden, da die Chromatogramme stark verschmiert waren. Es ließ sich allerdings schätzen, daß der Anteil an Purin zwar höher lag als bei der Hydrolyse, aber nach wie vor geringer war als der des Pyrimidins.

Bei F.spec. ergab die enzymatische Spaltung der Produkte, die aus der Triphosphatregion der Chromatogramme eluiert worden waren, daß fast ausschließlich UTP, vielleicht auch etwas CTP vorgelegen haben mußte.

Der deutliche Unterschied im prozentualen Anteil der markierten Pyrimidin- und Purinverbindungen wurde immer wieder beobachtet. Es lag daher nahe, den Anteil des C^{14} zu bestimmen, das über die Asparaginsäure in den Pyrimidinring gelangt. Bekanntlich wird bei der Synthese des Pyrimidinringes auch Asparaginsäure eingebaut, die über die C_3+C_1 -Addition gebildet und schon nach kurzer Zeit stark radioaktiv markiert wird. Wie aus Tabelle 17 zu ersehen ist, stammt die Radioaktivität zu 76.5 % aus dem C-Atom (C_2), das vom Carbamylphosphat geliefert wird und nur zu 23.5 % aus der Asparaginsäure ($C_{4,5}/C_{5,6}$).

Bei der Dephosphorylierung der Triphosphate trat eine markierte Substanz auf (Abb.10), bei der es sich möglicherweise um Gluconsäure handelt. Markierte 6-Phosphogluconsäure war schon von Moses et al. (16) bei Zygorhynchus moelleri gefunden worden.



Abbildung 8. Wie Abb.5.

Sarcina flava.

Fixierungszeit: 15 sec.

Gasphase: Luft.

Substrat: -

(Tab.14, Probe 4a).

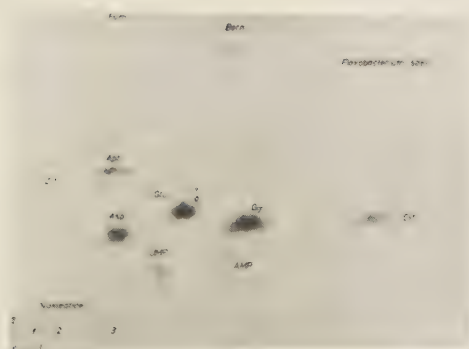


Abbildung 9. Wie Abb.5.

Flavobacterium spec.

Fixierungszeit: 1 min.

Gasphase: Luft.

Substrat: -

(Tab.16, Probe 2c).



Abbildung 10.

$C^{14}O_2$ -Fixierung durch
Flavobacterium spec.

Chromatographische Trennung der nach der enzymatischen Dephosphorylierung aus den Mischflecken 3 (Nukleosiddiphosphate) erhaltenen Nukleoside und Basen.

(S.d.S.49).



Abbildung 11.

$C^{14}O_2$ -Fixierung durch
Flavobacterium spec.

Chromatographische Auftrennung der Produkte des hydrolysierten Rückstandes der Probe 2f (Hy) (Tab.16).

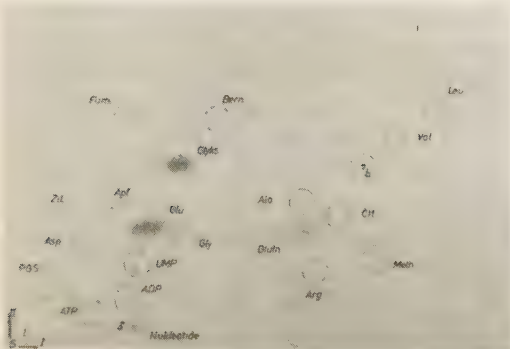


Abbildung 12. Wie Abb.5.

Corynebacterium nephridii.

Fixierungszeit: 10 min.

Gasphase: Luft.

Substrat: -

(Tab.19, 2c).



Abbildung 13. Wie Abb.11.

Corynebacterium nephridii.

(Tab.19, 2c).

3. Organismen mit Fixierung des $C^{14}O_2$ in Äpfel- und Asparaginsäure als Primär- und Folgeprodukte verschiedener Fixierungsmechanismen der C_3+C_1 -Addition.

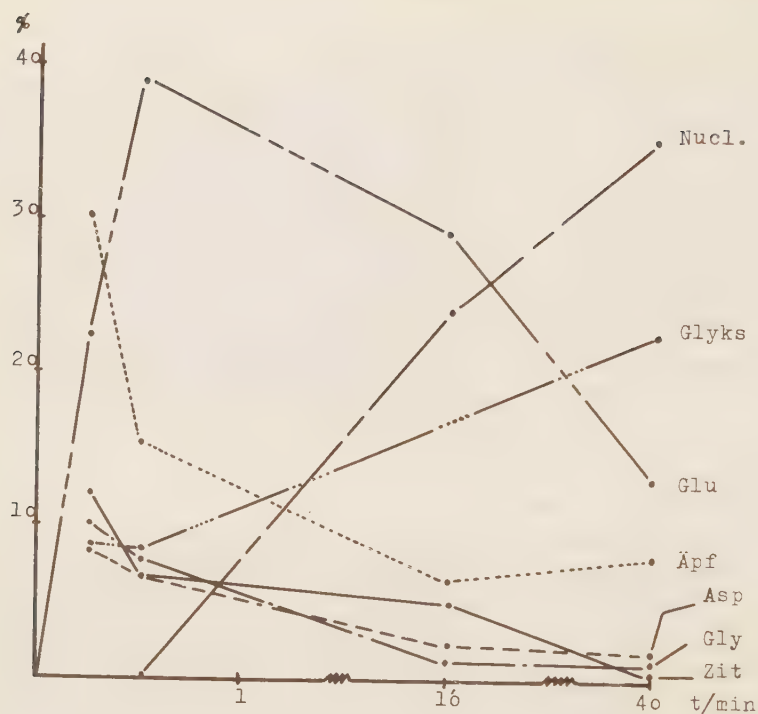
- a. Corynebacterium nephridii. (Corynebacteriaceae)
 Arthrobacter suboxydans.
 Nocardia flava. (Actinomycetales)
 Streptomyces griseus.
 Bacillus coagulans. (Bacillaceae)
- b. Propionibacterium (Propionibacteriaceae)
 freudenreichii.

a. Die Gesamtfixierungen zeigen in Abhängigkeit von der Fixierungszeit einen zunehmenden Einbau von C^{14} in die Zellsubstanzen der löslichen und unlöslichen Fraktionen bei C. nephridii (Tab.18), A. suboxydans (Tab.27), N. flava (Tab.20) und B. coagulans (Tab.23). Bei Str. griseus (Tab.25) enthielt das Lösliche die gesamte Aktivität.

Die Glucosefütterung bewirkte bei allen Organismen außer C. nephridii eine starke Zunahme der $C^{14}O_2$ -Fixierung. Bei N. flava wurde bei zwei verschiedenen alten Kulturen der Gehalt an Radioaktivität in den leichtflüchtigen Fraktionen nach einer Fixierungsdauer von 10 Minuten bestimmt. Fixierten die Zellen einer 48-stündigen Kultur $C^{14}O_2$, so enthielt die Fraktion der Neutralstoffe (Tab.20, F_n2a) 1.9 %, die der leichtflüchtigen Säuren 3.8 % der Gesamtaktivität. Bei der jüngeren Kultur mit noch nicht zerbrochenen Myzel (1a) erhöhten sich die Werte um das Zweieinhalbfache. Eine Analyse der Produkte wurde nicht vorgenommen.

Aus dem Diagramm 5 für C. nephridii und dem Diagramm 6 für N. flava kann der Verlauf der prozentualen Verteilung der markierten, löslichen Produkte abgelesen werden.

Die hier untersuchten Organismen unterscheiden sich von denen, die in den vorhergehenden Kapiteln behandelt wurden, im wesentlichen dadurch, daß der prozentuale Anteil der Äpfelsäure sehr viel höher ist und wie der der Asparagin- und Zitronensäure im Verlauf der $C^{14}O_2$ -Fixierung abnimmt. Die Glutaminsäure ist wie bei Ps. pyocyanea, S. flava, M. lysodeikticus und F. spec. relativ stark markiert. Ferner enthält auch bei C. nephridii und N. flava das Glykokoll nach kurzer Fixierungszeit einen hohen Prozentsatz an C^{14} .



Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. Ipm	Lösl. %	Unlös %
1a	0.50	42 600	88	12
1b	1	99 242	86	14
1c	1/+	116 974	87	13
1d	3	165 590	71	29
1e	10	166 050	67	33
2a	0.25	18 518	85	15
2b	0.50	35 372	88	12
2c	10	252 774	64	36
2d	40	346 544	68	32

Diagramm 5.

Wie Diagr.1

*Corynebacterium
nephridii.*

(Vers.2,Tab.19)

Tabelle 18.

Wie Tab.6.

*Corynebacterium
nephridii.*

Vers.Nr.	1a	1b	1d	1e	2a	2b	2c *	2d	1c	2c •	2d
Verbindungen %	Inkubationszeit / min									Hy	Hy
	0.50	1	3	10	0.25	0.50	10	40	1/+	10	40
Asp	6.7	4.8	5.1	6.0	8.2	6.6	2.3	1.8	2.4	39	38
Glu	41	43	36	26	19	26	21	10	38	33	29
Glutn	5.4	5.4	6.8	11	2.8	13	7.7	3.4	3.4	-	-
Gly	5.6	1.9	2.8	-	10	7.6	1.2	1.2	6.0	-	-
Ala	-	2.9	2.3	-	-	-	1.3	0.80	1.9	2.4	2.1
Cit	-	2.1	2.5	-	2.0	7.2	0.99	0.60	1.8	-	-
Arg	-	-	-	-	-	-	1.4	0.91	-	-	-
Meth	-	-	-	-	-	-	1.3	0.93	-	8.5	14
Thre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.1	2.8
DAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	9.0
Val	-	-	-	-	-	-	2.3	2.7	-	-	-
Leu	-	-	-	-	-	-	1.3	1.6	-	Prolin	
Äpf	15	8.1	5.9	7.5	30	15	4.8	6.3	11	-	1.8
Fum	8.2	3.4	1.9	1.5	7.6	4.3	1.6	1.3	4.1	Cystein	
Bern	11	6.6	6.9	3.8	-	3.4	1.0	1.6	4.9	2.9	4.4
Zit	4.3	1.4	1.5	1.2	12	6.7	6.1	0.58	0.99	-	-
Glyks?	-	-	-	-	8.5	8.2	17	22	-	-	-
Glyzs	-	-	-	1.8	-	-	-	0.80	-	-	-
1	-	5.9	8.5	15	-	-	12	25	5.9	-	-
2	-	1.5	5.6	4.7	-	-	-	2.4	3.1	-	-
3	-	2.4	6.0	5.5	-	-	6.1	4.9	3.0	-	-
UMP	3.1	5.8	2.4	3.4	-	-	3.8	-	5.7	-	-
AMP !!!	-	2.1	3.3	9.1	-	-	2.0	2.5	4.1	-	-
PGS	-	1.5	2.7	2.0	-	-	1.2	2.1	1.4	-	-
Sonst.	-	1.2	-	1.5	-	2.0	3.6	6.0	2.4	-	-

Tabelle 19. Wie Tab.7. *Corynebacterium nephridii*.

Hy = Hydrolysate des Proteins.

* = Abb.12

• = Abb.13

Bei C. nephridii (Tab.19) ist die Äpfelsäure mit 15 % nach 30 Sekunden (1a,2b) in beiden Versuchsserien stärker markiert als die Asparaginsäure und Zitronensäure mit zusammen 11 % (1a) bzw. 13 % (2b). In der gleichen Zeitspanne wurden neben der Äpfelsäure auch die Fumar- und Bernsteinsäure relativ stark radioaktiv markiert. Alle drei Säuren nehmen im Verlauf der Fixierungszeit prozentual ab.

Bemerkenswert ist, daß in Versuchsserie 2 der Anteil des Glykokolls von 10 % nach 15 Sekunden (2a) auf 1.2 % nach 40 Minuten (2d) sinkt, während er gleichzeitig bei der Glykolsäure von 8.5 % auf 22 % steigt. Dazu sei einschränkend gesagt, daß die Glykolsäure auch bei anderen Organismen niemals mit Erfolg cochromatographiert wurde. Sie ist auf Papierchromatogrammen schwer nachweisbar, da sie schon während der Lagerung auf Röntgenpapier zum größten Teil abdiffundiert und nur mehr an der Lage und am Aktivitätsschwund (Vergleich mit Schwärzung ähnlicher Intensität bei anderen Flecken) erkannt werden kann. Der prozentuale Anteil wurde auf Grund der Schwärzung des Röntgenfilms geschätzt.

Im Gegensatz zu Versuchsserie 1 zeigte Versuchsserie 2 in den Proben 2c und 2d eine intensivere Verteilung des C^{14} in Sekundärprodukte. So wurden das Methionin und neben dem Citrullin auch das Arginin als dessen unmittelbares Folgeprodukt markiert. Darüberhinaus fand sich Radioaktivität im Valin und Leucin, was sonst nur selten beobachtet wurde.

Die Pyrimidinnucleotide waren nach einer Fixierungszeit von 10 Minuten in Versuchsserie 1 mit 29 % (1e), in Versuchsserie 2 mit 22 % (2c), die Purinnucleotide mit 9.1 % bzw. 2.0 % an der Gesamtaktivität der löslichen Fraktionen beteiligt.

Wie bereits ausführlich geschildert (s.d.S.58), wurden die RNS und DNS von der Fraktion des Unlöslichen dadurch abgetrennt, daß sie enzymatisch in die löslichen Bestandteile übergeführt wurden.

Die Hydrolyse des Proteins (Tab.19, Hy 2c,2d) ergab, daß neben den Aminosäuren, deren Synthese sich bekanntlich von der Asparagin- oder Glutaminsäure ableitet, noch Alanin als C_3 -Aminosäure markiert war. Wie bei Ps.pyocyanea enthält auch bei C. nephridii die Zellwand DAP.

Bei N. flava (Tab.22) enthielt die lösliche Fraktion 4a (30 sec) zwar markierte Äpfel- (12%), Asparagin-(9.5%) und Zitronensäure (3.7%), jedoch im Gegensatz zu C. nephridii keine radioaktive Fumar- und Bernsteinsäure.

Der mit 24 % hohe Anteil des Glykokolls fällt auf 15 % nach 1 Minute (4b) ab, während die Glutaminsäure im gleichen Zeitraum von 14 % auf

Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. Ipm	Lösl. %	Unlös. %	F _n /%	F _s /μ
1a	10	196 308	85.80		4.8	9.4
2a	10	2 610 692	94.30		1.9	3.8
3a	5	76 728	57	43		
3b	30	988 448	78	22		
3c	5/+	1 142 580	90	10		
3d	30/+	1 465 440	95	5.0		
4a	0.50	43 554	97	3.0		
4b	1	93 984	96	4.0		
4c	1/+	239 248	96	4.0		
4d	3	624 346	85	15		
4e	10	796 620	67	33		
4f	40	1 293 222	62	38		

Tabelle 20.

Wie Tab.6.

Nocardia flava.

1a = 12-stündige Kultur.

Myzel nicht zerbrochen.

2a = 48-stündige Kultur.

Myzel völlig zerbrochen.

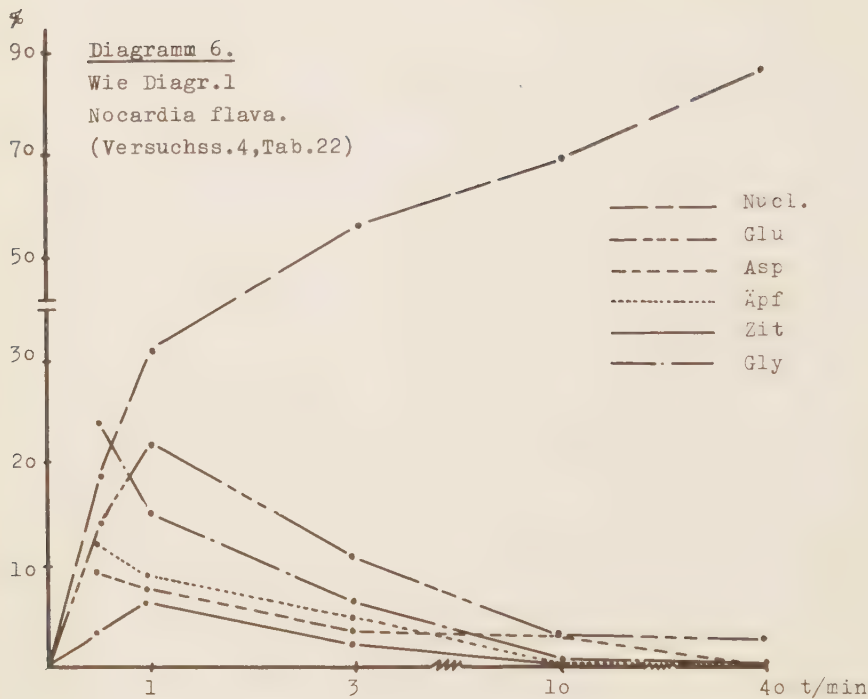
Verbindungen %	4d	4e	4f	Nr.
	3	10	40	t/min
Asp	23	11	13	
Glu	-	-	4.2	
Meth	8.7	10	36	
Uracil	64	73	40	
Guanin	4.6	4.6	6.0	
Adenin	-	1.9	1.4	

Tabelle 21.

Wie Tab.10.

Nocardia flava.

Proteinhydrolysate.



22 % zunimmt.

Überraschend hoch war schon nach kurzer Zeit der Einbau von $C^{14}O_2$ über das Carbamylphosphat und die Aminoimidazolribonucleotid-Carboxylase. Im Vergleich zu allen anderen hier untersuchten Organismen erreichte der Aktivitätsanteil der Nucleotide in Versuchsserie 4 mit 79% nach 40 Minuten (4f) einen absoluten Höchstwert. Es entfielen auf die Nucleosidtriphosphate und das UDPG 43 %, auf die Nucleosiddiphosphate 14 % und allein auf das AMP 22 %. Als frühes Syntheseprodukt und als Vorläufer der verschiedenen Purinnucleotide ist das IMP bereits nach 30 Sekunden (4a) mit 4.5 % an der Gesamtaktivität beteiligt. Sein prozentualer Anteil nimmt im weiteren Verlauf der $C^{14}O_2$ -Fixierung zugunsten des AMP ab. Der außergewöhnlich hohe Einbau des $C^{14}O_2$ in die Purinnucleotide führte dazu, daß über das ATP meßbare Aktivität in das NADP (3b, 4d-f) und NAD (3b) gelangte.

Der starke Umsatz der Pyrimidin- und Purinnucleotide zeigt sich im Auftreten markierten Uridins und Adenosins (Adenins) im Löslichen.

Vers.Nr.	3a	3b [*]	3c	3d	4a	4b	4d	4e	4f	* 4c
Verbindungen %	Inkubationszeit / min									
	5	30	5/+	30/+	0.50	1	3	10	40	1/+
Asp	5.6	0.65	0.29	0.25	9.5	7.9	3.8	3.1	-	3.2
Glu	39	22	77	86	14	22	11	3.5	3.2	50
Glutn	-	-	6.7	3.2	-	-	-	-	0.80	1.4
Gly	3.6	1.7	1.9	0.17	24	15	6.2	0.93	0.61	3.7
Cit	32	27	4.0	3.1	5.0	3.6	6.6	5.1	2.1	3.5
Pro	-	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-
Äpf	3.1	0.44	1.6	0.16	12	9.0	5.3	0.66	-	6.7
Zit	4.6	-	0.29	-	3.7	6.8	2.4	-	-	3.8
α-KGS	-	0.30	0.60	1.5	-	-	-	-	-	-
Glyzs	2.7	0.20	0.37	0.40	-	1.7	1.1	0.68	-	1.3
PGS/PEB	0.54	-	-	-	1.8	1.6	2.1	1.1	-	0.40
1/2	7.2	19 ^x	1.1	1.3	11	14	34	42	43	8.5
3	-	9.2	1.0	0.66	-	2.1	11	28	14	2.5
UMP	-	0.78	0.25	-	7.7	5.5	2.6	1.3	-	4.0
AMP ^{!!!}	-	1.7	0.35	0.17	-	1.0	3.2	4.7	22	2.5
IMP	-	0.80	-	-	4.5	5.5	2.5	1.1	-	4.6
NMP	-	-	-	-	5.5	3.0	3.0	2.2	-	2.6
Uridin	-	1.1	0.20	0.16	-	-	-	-	1.4	-
Adenosin [*]	-	6.6	-	-	-	-	-	-	2.8	-
Adenin	-	3.6	-	-	-	-	-	-	3.9	-
NADP	-	0.87	0.41	0.22	-	-	1.5	4.3	3.0	-
NAD	-	3.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Sonst.	1.7	-	4.0	2.8	1.3	1.3	3.7	2.0	3.2	1.3

Tabelle 22. Wie Tab.7. *Nocardia flava*.

x = Enthält ADP * = Enthält Val., Leu.

* = S.d.Abb.14 • = S.d.Abb.15

Diese Substanzen sind bekanntlich keine Zwischenprodukte der Nucleotid- und Nucleinsäuresynthese, sondern entstehen vielmehr beim Abbau der Nucleinsäuren. Daher erscheinen sie auf den Chromatogrammen auch erst nach relativ langen Fixierungszeiten (3b,4f).

Im Rückstand (Tab.21) betrug der Anteil der durch die Hydrolyse größtenteils zerstörten Purinbasen wie erwartet nur wenige Prozent (4d). Dagegen enthielt das Uracil im Hydrolysat 4d 64 % der Gesamtaktivität. Die Asparaginsäure und das Methionin liegen mit zusammen 32 % um die Hälfte niedriger.

Im Vergleich zur Versuchsserie 4 wurde in den Proben ohne Glucosezusatz (3a,b) der Versuchsserie 3 mehr $C^{14}O_2$ in das Citrullin und weniger in die Nucleotide eingebaut (vgl. d.a. Abb.15). In den Parallelansätzen mit Glucose als Substrat (3c,d) fixierten die Zellen bevorzugt $C^{14}O_2$ über die Mechanismen der C_3+C_1 -Addition, was die Anhäufung des C^{14} in der Glutaminsäure beweist. Der prozentuale Anteil des Citrullins und der Nucleotide liegt dementsprechend niedrig.

Bei Streptomyces griseus (Tab.26) nimmt der prozentuale Anteil der Asparagin-, Zitronen- und Äpfelsäure in Abhängigkeit von der Fixierungszeit deutlich zugunsten der Glutaminsäure ab. Die Pyrimidinnucleotide enthalten nach 30 Minuten (1c) 11 % der Gesamtaktivität. Markierte Purinnucleotide wurden nicht gefunden, doch ist es möglich, daß sie zu einem allerdings geringen Prozentsatz den Pyrimidinnucleotiden beigemischt waren.

Die Glucosefütterung zeigte wie schon bei N. flava eine intensivere Verteilung der Radioaktivität in die Folgeprodukte der C_3+C_1 -Addition.

Die bei Arthrobacter suboxydans (Tab.28) und Bacillus coagulans (Tab.24) gefundene Verteilung der radioaktiv markierten Produkte entspricht der von Str. griseus. Neben den Fixierungsprodukten der C_3+C_1 -Addition ist hier wie dort das Citrullin markiert. Im Glykokoll wurde nur wenig Aktivität gefunden. Als Unterschied bemerkenswert ist, daß bei A. suboxydans die Adenosinnucleotide 11 % und die Pyrimidinnucleotide 17 % der Gesamtaktivität enthielten. Ferner wurde bei diesem Organismus wie auch bei B. coagulans zwar die Bernsteinsäure, nicht Sa- gegen die Fumarsäure markiert.

Diskussion.

Wie bereits betont, weist sich vor allem bei C. nephridii die Äpfelsäure neben der Oxalessigsäure als ein primäres Fixierungsprodukt aus. Für ihre Synthese über die Malic-Enzym-Reaktion sprechen der hohe

Vers.Nr.	lb	lc
Verbindungen %	Ink'szeit	
	10/+	60/+
Asp	18	10
Glu	27	26
Glutn	-	2.4
Cit	2.0	1.4
Äpf	20	5.7
Fum	-	-
Bern	13	13
Zit	2.1	1.3
α-KGS	-	11
1	2.3	3.6
2	1.9	7.0
3	6.2	15
UMP	2.4	1.0

Tabelle 24.

Wie Tab.7.

Bacillus coagulans.

Vers.Nr.	la	lb	lc	ld	le
Verbindungen %	Inkubationszeit/min				
	3	5	30	1/+	40/+
Asp	20	13	2.4	34	4.6
Glu	51	69	76	-	75
Glutn	-	-	0.95	-	1.8
Gly	-	2.0	2.2	-	2.9
Ala	-	-	-	-	0.74
Thre	-	-	-	-	1.9
Cit	-	-	1.0	-	0.91
Äpf	14	1.1	2.7	14	1.0
Zit	14	9.7	2.5	52	1.5
Glyzs	-	0.38	0.82	0.36	1.3
1	1.0 4.2		3.8	-	1.1
2			7.5	-	3.5
3	-	-	-	-	0.74
UMP	-	-	-	-	0.60

Tabelle 26. Wie Tab.7.

Streptomyces griseus.

Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. Ipm	Lösl. %	Unlös. %
la	10	13 000	-	-
lb	10/+	163 304	81	19
lc	60/+	296 960	73	27

Tabelle 23. Wie Tab.6.

Bacillus coagulans.

Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. Ipm
la	3	10 000
lb	5	22 008
lc	30	190 476
ld	1/+	13 466
le	40/+	484 240

Tabelle 25. Wie Tab.6.

Streptomyces griseus.

Vers.Nr.	1a	1b	1c
Verbindungen %	Ink'szeit/min		
	10	40	10/+
Asp	17	10	5.0
Glu	26	38	70
Glutn	-	4.5	
Gly	-	-	0.70
Thre	-	1.6	2.0
Cit	12	8.5	6.4
Äpf	5.3	3.8	2.0
Bern	-	-	0.65
Zit	-	1.7	1.2
α -KGS	5.6	3.5	-
Glyzs	-	-	0.63
PGS	-	0.45	0.52
1	6.6	3.9	1.2
2	7.4	7.0	1.0
3	2.7	9.3	0.73
AMF	11	6.8	2.6
Sonst.	-	1.0	3.6

Tabelle 28. Wie Tab.7.

Arthrobacter
suboxydans.

Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. I _{pm}	Lösl. %	Unlös %
1a	10	52 984	82	18
1b	40	120 204	73	27
1c	10/+	474 240	92	8.0

Tabelle 27. Wie Tab.6.

Arthrobacter
suboxydans.

prozentuale Anteil an der Gesamtaktivität nach kurzer Fixierungszeit und der rasche Aktivitätsaustausch mit der Fumarsäure.

Man könnte nun einwenden, daß auch hier das C¹⁴ ausschließlich über die Oxallessigsäure in das Malat gelangt, wie dies bei den schon behandelten Organismen angenommen wurde. Der Anteil betrug dort jedoch in der Regel nicht mehr als 5 %. Bei den hier vorliegenden hohen Prozentsätzen würde diese Annahme voraussetzen, daß ein starker Austausch der Radioaktivität über die Malic-Dehydrogenase gegen den Stoffumsatz des Zitronensäurezyklus erfolgt. Eine zu diesem Zeitpunkt noch voll funktionsfähige Atmungskette dürfte jedoch das Angebot an reduzierten Nicotinamid-adenin-dinucleotiden so niedrig halten, daß das Gleichge-

wicht ganz auf der Seite der oxydierten C_4 -Körper liegt und nur wenig markierte Oxalessigsäure in Äpfelsäure umgewandelt wird.

Dagegen ist der rege Stoffaustausch bei der Fumarase-Reaktion nicht behindert, da lediglich eine Wasserabspaltung bzw. -anlagerung stattfindet.

Da der Mangel an NADH auch die Hydrierung der Fumarsäure in Grenzen hält, wird die Bernsteinsäure wahrscheinlich nicht auf diesem Wege, sondern über den Glyoxylat-Shunt markiert. Im Unterschied zu den im vorigen Kapitel behandelten Organismen sind hier die Bedingungen für die Bildung markierten Succinats besonders günstig. Der schnelle Austausch des C^{14} zwischen der α - und β -Carboxylgruppe des Malats über die Fumarsäure führt dazu, daß schon nach kurzer Zeit ein hoher Prozentsatz "doppeltmarkierter" Oxalessigsäure und damit auch Isozitronensäure vorliegt. Indirekt bestätigt der hohe prozentuale Anteil markierter Bernsteinsäure die Annahme einer $C^{14}O_2$ -Fixierung über die Malic-Enzym-Reaktion. Würde nämlich primär ausschließlich Oxalessigsäure gebildet, müßte der Anteil der über Äpfel-Fumarsäure ausgetauschten und damit doppeltmarkierten Oxalessigsäure im Verhältnis zum β -markierten Oxalacetat relativ gering sein.

Die im Glyoxylat-Shunt neben der Bernsteinsäure auftretenden Glyoxylsäure wird offensichtlich zu Glykokoll aminiert. Mit zunehmender Fixierungszeit häuft sich infolge des Stickstoffmangels Glykolsäure an.

Ob über die Malat-Synthetase eine C_2+C_2 -Kondensation stattfindet, kann nicht entschieden werden, da die weitaus stärkere Synthese der Äpfelsäure über das Malic-Enzym den bei F. spec. beschriebenen "Überlagerungseffekt" (S.57) nicht sichtbar werden läßt.

Bei N. flava zeigte sich bereits nach 30 Sekunden ein hoher prozentualer Anteil markierten Glykokolls. Möglicherweise wird bei diesem Organismus auch die Äpfelsäure über den Glyoxylat-Bypass gebildet, so daß hier Zweifel an der Existenz des Malic-Enzyms gerechtfertigt sind.

Bei Str. griseus spricht der anfangs hohe und bei B. coagulans sowie A. suboxydans der noch nach 10 Minuten relativ hohe prozentuale Anteil der Äpfelsäure für eine mögliche Beteiligung des Malic-Enzyms an der Synthese der C_4 -Verbindungen. Die Proteinfractionen wurden bei diesen Organismen nicht untersucht. Bei Str. griseus liegen entsprechende Untersuchungen bereits vor. Butterworth et al., 1955, (105) ließen den genannten Organismus mehrere Stunden in Gegenwart von

$C^{14}O_2$ wachsen und studierten den Einbau von C^{14} in die Proteinfraktion. Sie fanden markierte Asparagin- und Glutaminsäure, markiertes Glykokoll, Threonin und Serin. Der Abbau der Glutaminsäure ergab, daß 96 % der Aktivität in der α -Carboxylgruppe und nur 4 % in der γ -Carboxylgruppe festgelegt waren. Dies Ergebnis entspricht einer $C^{14}O_2$ -Fixierung über die C_3+C_1 -Addition und der Verteilung des C^{14} über den Zitronensäurezyklus. Die Verfasser schließen aus der Tatsache, daß Glykokoll und Serin stark, Alanin dagegen überhaupt nicht markiert wurde, auf die α - β -Spaltung einer Säure, die sich von der Oxallessigsäure ableitet. Diese damals vermutete Reaktion dürfte mit der heute bekannten C_4+C_2 -Spaltung der Isozitronensäure identisch sein.

b. Propionibacterium freudenreichii.

Ein Vergleich der Gesamtfixierungen (Tab.29) zeigt eine deutliche Erhöhung der Fixierungsraten bei Glucosefütterung. Der prozentuale Anteil der unlöslichen Fraktionen an den Gesamtfixierungen ist unerheblich. Die Aufarbeitung der flüchtigen Fraktionen von zwei Proben (1a,2a), für die das Zellmaterial aus verschiedenen Kulturen gewonnen wurde, ergab, daß zu einem prozentual hohen Anteil die Fraktion der leichtflüchtigen Säuren (F_8) markiert waren. Sie enthielten fast ausschließlich Propionsäure.

Bei den Propionibakterien wurde der Mechanismus der CO_2 -Fixierung durch Wood et al.(10) in einer Reihe von Arbeiten aufgeklärt. Die C_3+C_1 -Addition führt über die P_{En}B-Carboxytransphosphorylase zu markierter Oxallessigsäure (47), die von der Malic-Dehydrogenase reduziert wird und über die Äpfelsäure in einen Zyklus eintritt, in dessen Verlauf durch die Reaktion der Transcarboxylase (katalytische C_1 -Übertragung auf Pyruvat) aus den schrittweise umgewandelten C_4 -Verbindungen Propionsäure gebildet wird (vgl.d.S.10). Da die Reaktionen über die symmetrische Fumarsäure verlaufen, gelangt das C^{14} schließlich in die Propionsäure. Dem entspricht der hier gefundene prozentual hohe Anteil dieser Fraktion an der Gesamtaktivität. Ferner reichert sich C^{14} auch in der Bernsteinsäure an, wie aus der prozentualen Verteilung der nicht-flüchtigen, löslichen Produkte in Tabelle 30 zu ersehen ist.

Daneben sind die enzymatischen Voraussetzungen für das Funktionieren zumindest eines Teiles des Zitronensäurezyklus gegeben, denn es treten sowohl markierte Zitronensäure als auch Glutaminsäure auf. Unter den

Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. Ipr	Lösl. %	Unlös %	F _n /%	F _s /%
1a	10	1 378 038	73.00		0.30	26.70
2a	5/+	11 523 794	58.00		0.30	41.70
3a	5	902 340	98	2.0	<u>Tabelle 29.</u> Wie Tab.6. Propionibacterium freudenreichii. Gasphase: N ₂ .	
3b	30	2 236 712	97	3.0		
3c	5/+	2 325 180	98	2.0		
3d	30/+	2 700 040	95	5.0		

Vers.Nr.	3a	3b *	3c	3d
Verbin= dungen %	Inkubationszeit/min			
	5	30	5/+	30/+
Asp	4.3	4.4	2.0	1.6
Aspn	1.0	0.97	0.91	0.31
Glu	3.3	12	1.7	4.4
Gly/Ser	1.2	0.40	-	-
Ala	0.47	0.72	1.3	0.53
Cit	44	45	12	12
Arg	-	-	-	0.38
Äpf	6.5	4.1	9.9	6.4
Fum	4.2	1.1	3.2	3.1
Bern	33	21	63	65
Zit	0.77	0.83	0.54	0.30
PGS	-	0.30	0.77	0.50
1,2,3	0.90	6.0	2.8	2.9
UMP	0.51	0.82	0.77	0.31
AMP !!!	-	0.40	0.42	0.54
Sonst.	-	2.0	1.5	1.0

Tabelle 30. Wie Tab.7.

Propionibacterium
freudenreichii.

Gasphase: N₂.

* = S.d.a.Abb.16

hier vorliegenden anaeroben Verhältnissen dürften die vorhandenen Reaktionsschritte vor allem der Synthese der Glutaminsäure dienen. Bei *P. pentosaceum* konnte der Zitronensäurezyklus von Delwiche und Carson, 1953, (106) nachgewiesen werden. Delwiche (107) hatte schon 1948 beim gleichen Organismus ein sehr wirksames Bernsteinsäure-Decarboxylierungssystem studiert.

Zu den nach relativ langer Fixierungszeit markierten Produkten gehören neben den bereits genannten noch die Phospho-glyzerinsäure, das Alanin, Glykokoll und Serin.

Außerordentlich hoch war der Einbau von $C^{14}O_2$ über das Carbamylphosphat in das Citrullin. In den Proben 3a und 3b (Tab.30) ist es mit 44 % bzw. 45 % an der Gesamtaktivität des Löslichen beteiligt. (Vgl.d.a.Abb.16). Der Anteil der Pyrimidinnucleotide war dagegen mit 6.8 % nach 30 Minuten (3b) ohne Glucosezusatz am höchsten. Der Aktivitätsanteil der Purinnucleotide lag in allen Proben unter einem Prozent.

Die Zugabe von Glucose bewirkte eine Erhöhung der Gesamtfixierung zugunsten der Propionsäuregärung. In den Proben 3c und 3d erhöhte sich der prozentuale Anteil der Bernsteinsäure beträchtlich. Das Citrullin enthielt nur mehr 12 % der Gesamtaktivität. In Probe 2a (Tab.29) wurden bereits nach einer Fixierungszeit von 5 Minuten über 41 % der Gesamtaktivität in der Propionsäure gefunden.

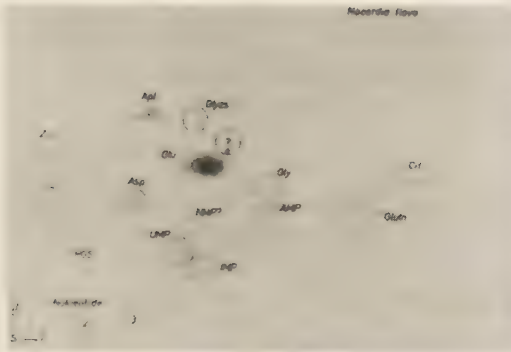


Abbildung 14. Wie Abb.5.

Nocardia flava.

Fixierungszeit: 1 min.
Gasphase: Luft.
Substrat: Glucose (0.1% E).
(Tab.22, Probe 4c).

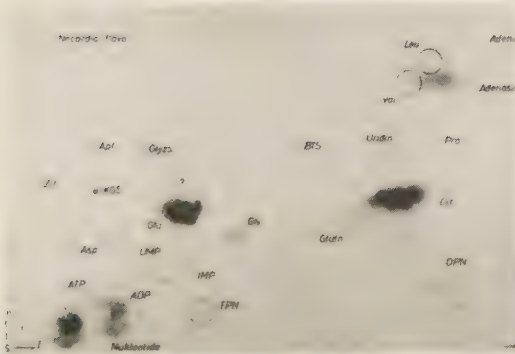


Abbildung 15. Wie Abb.5.

Nocardia flava.

Fixierungszeit: 30 min.
Gasphase: Luft.
Substrat: -
(Tab.22, Probe 3b).

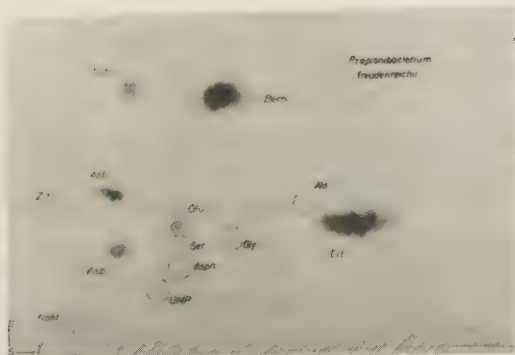


Abbildung 16. Wie Abb.5.

Propionibacterium
freudenreichii.

Fixierungszeit: 30 min.
Gasphase: Stickstoff.
Substrat: -
(Tab.30, Probe 3b).

4. Organismen mit überwiegender Fixierung des $C^{14}O_2$ in Äpfelsäure als Primärprodukt der Malic-Enzym-Reaktion.

Aerobacter aerogenes.

Serratia marcescens. (Enterobacteriaceae)

Escherichia coli.

Aerobacter aerogenes.

Das Zellmaterial dieses fakultativ anaeroben Organismus der Coli-Aerogenes-Gruppe stammte aus einer aeroben Schüttelkultur. Die geernteten und gewaschenen Zellen wurden in einer Versuchsserie (Tab.31) auf insgesamt 10 Proben (2a-2l) verteilt, von denen sechs (2a-2f) vor der Zugabe des $NaHC^{14}O_3$ belüftet und vier (2g-2l) mit Stickstoff begast wurden. Letztere enthielten zudem Glucose als Substrat.

In den mit Luft durchspülten Proben verdoppelte sich die Gesamtfixierung nur im ersten Intervall proportional zur Zeit (Probe 2a,b). Absolut zu niedrig liegen dagegen die Werte für 3 (2d) und 10 Minuten (2e). Der in Abhängigkeit von der Fixierungszeit von 2 % auf 39 % zunehmende Einbau von C^{14} in die unlöslichen Zellbestandteile spricht für den Umsatz der primären Fixierungsprodukte im Stoffwechsel. Die Glucosefütterung bewirkte in Probe b (Vers.2) keine Erhöhung der Gesamtfixierung. Dagegen bauten die Zellen in den Proben c und d der Versuchsserie 1 vermehrt $C^{14}O_2$ ein.

Unter Stickstoff wurde zwar sehr viel $C^{14}O_2$ in die löslichen Produkte fixiert, doch gelangte nur mehr wenig C^{14} in das Unlösliche (Tab.31,2g-2l).

Die leichtflüchtigen Fraktionen (3a,3b) enthielten nur wenig Aktivität, gleichgültig ob die Zellen unter Stickstoff oder in Gegenwart von Sauerstoff $C^{14}O_2$ fixierten.

Wie dem Diagramm 7 zu entnehmen ist, betrug der prozentuale Anteil der Äpfelsäure an der Gesamtaktivität der nicht-flüchtigen, löslichen Fraktion nach 30 Sekunden 54 % und nach 30 Minuten nur mehr 10 %. Die Werte der Asparaginsäure bleiben dagegen mit 17 % über 10 Minuten konstant. Im Fall der Zitronensäure steigen sie sogar von 2.4 % auf 6.1 %. Der prozentuale Anteil beider Säuren nimmt im weiteren Verlauf der Fixierung wie der der Äpfel- und Fumarsäure zugunsten der Bernsteinsäure ab.

Die Tabelle 33 zeigt darüberhinaus, daß im Vergleich zu den bisher behandelten Organismen das Alanin und die Phosphoglyzerinsäure relativ stark markiert sind. Daß die Glutaminsäure mit maximal 4.1 % nach

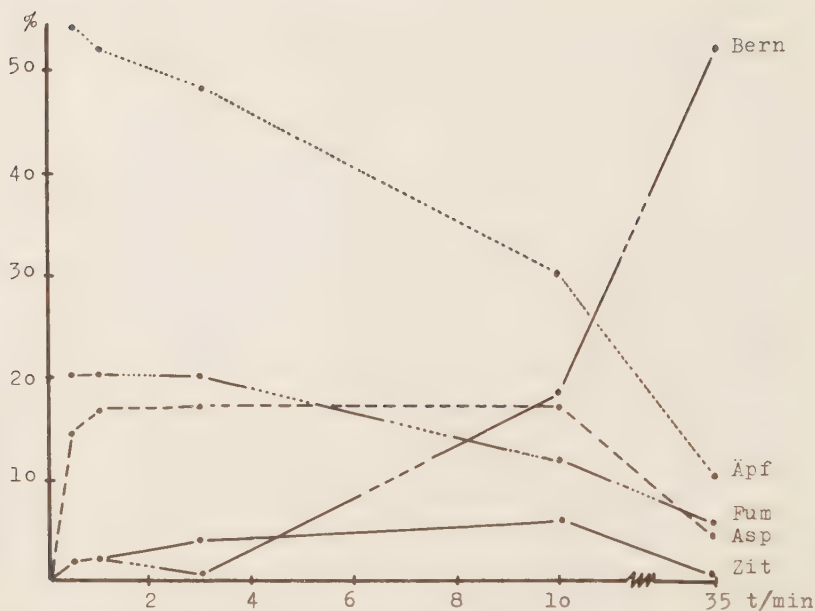
Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. l.m	Lösl. %	Unlös. %	F _N /‰	F _S /‰
1a	5	167 634	79	21	-	-
1b	30	183 274	56	44	-	-
1c	5/+	193 664	83	17	-	-
1d	30/+	323 870	48	52	-	-
2a	0.50	263 750	98	2.0	-	-
2b	1	469 440	97	3.0	-	-
2c	1/+	450 900	94	6.0	-	-
2d	3	237 716	93	7.0	-	-
2e	10	116 724	61	39	-	-
2f	35	484 848	79	21	-	-
3a	10	1 452 484	96.30		3.5	0.20
2g	0.50/+	242 792	96	4.0	-	-
2h	1/+	277 250	97	3.0	-	-
2k	10/+	1 793 610	99	1.0	-	-
2l	30/+	1 745 712	99	1.0	-	-
3b	10	2 988 030	99.20		0.70	0.10

Tabelle 31. Wie Tab.6. *Aerobacter aerogenes*.

1a - 1d
2a - 2f = Gasphase: Luft.
3a

2g - 2l = Gasphase: Stickstoff.
3b

10 Minuten (2e) nur wenig an der Gesamtaktivität beteiligt ist, hängt mit der geringen Poolgröße zusammen. Die Hydrolyse des Unlöslichen der Proben 2e und 2f (Tab.32) ergab, daß sie immerhin 14 % bzw. 24 % der in diesen Fraktionen gemessenen Gesamtpulse enthielt. Das meiste C¹⁴ wurde mit 81 % bzw. 68 % in der Asparaginsäure gefunden. Der Anteil des Uracils lag in beiden Proben unter 5 %. Dies entspricht der langsamen Markierung der Nucleotide in den löslichen Fraktionen. Sie



Vers.Nr.	2g *	2h	2k	2l	2e	2f
Verbindungen	Inkubationszeit/min				Hy	Hy
	%	0.5/+	1/+	10/+	30/+	10 35
Asp	2.5	2.4	0.22	0.60	81	68
Glu	0.31	0.40	0.41	0.46	14	24
Gly	5.1	3.7	0.29	0.67	-	-
Ala	-	-	0.46	0.54	-	-
Meth	-	-	-	-	-	4.0
Äpf	6.0	5.1	0.32	1.4	-	-
Fum	2.7	2.6	0.49	1.0	-	-
Bern	82	81	90	84	-	-
Zit	-	-	-	-	-	-
Milchs	1.8	4.8	7.6	11	-	-
Uracil	-	-	-	-	4.6	4.3

Diagramm 7. Wie Diagramm 1.

Aerobacter
aerogenes.

(Versuchsserie 2, Tab. 33)

Tabelle 32. Wie Tab. 7.

Aerobacter
aerogenes.

Gasphase: N₂.

* = S. d. Abb. 18

Hy 2e, 2f : Wie Tab. 10.

Hydrolysate des unlöslichen der luftgespülten Proben 2e und 2f in Tab. 33.

Vers.Nr.	1a	1b	1c	1d	2a *	2b	2d	2e	2f	2c
Verbindungen %	Inkubationszeit / min									
	5	30	5/+	30/+	0.50	1	3	10	35	1/+
Asp	16	16	6.6	2.3	15	17	17	17	4.5	8.6
Glu	5.8	3.8	14	1.8	1.8	1.3	2.9	4.1	0.65	6.4
Glutn	-	-	18	1.6	-	-	-	-	-	1.0
Gly	9.6	11	2.3	1.6	-	-	-	-	-	1.1
Thre	2.2	1.8	2.4	0.63	0.31	0.39	0.75	0.85	1.3	0.80
Ala	6.5	7.6	0.73	-	0.73	1.4	0.84	2.0	1.2	0.29
Cit	-	-	-	0.94	-	-	-	-	0.59	-
Äpf	26	21	9.3	3.0	54	52	48	30	10	23
Fum	12	6.0	3.3	-	20	20	20	12	5.3	8.9
Bern	1.7	-	7.9	1.1	1.9	2.0	0.54	18	68	33
Zit	4.0	4.4	4.6	13	2.3	2.4	4.2	6.1	0.33	9.5
α-KGS	1.2	0.90	7.8	2.5	-	-	-	-	-	-
Glyzs	0.55	0.39	0.35	1.8	-	-	0.24	-	0.10	0.16
BTS	1.0	1.5	1.6	1.8	0.33	0.39	0.38	-	-	-
PGS	4.7	5.5	0.82	0.49	3.0	2.7	5.1	10	0.92	1.0
1	0.85	4.4	4.5	25	-	-	-	-	2.2	2.3
2	1.0	1.7	8.9	24	-	-	-	-	2.2	0.84
3	2.6	1.9	0.35	2.4	-	-	-	-	0.58	-
UMP	1.4	3.0	1.6	2.6	-	-	-	-	0.33	0.56
AMP	1.7	4.6	3.2	1.6	-	-	-	-	-	-
Uridin	-	2.7	-	4.1	-	-	-	-	-	-
Sonst.	1.2	1.8	1.7	*7.7	-	-	-	-	1.8	2.5

Tabelle 33. Wie Tab.7. *Aerobacter aerogenes*.

Gasphase: Luft. * = Enthält u.a. Val,Leu, Adenosin.

* = S.d.a.Abb.17.

wiesen dort erst nach einer Fixierungszeit von 35 Minuten (Tab.33,2f) meßbare Aktivität auf. Bei Glucosefütterung (2c,1 min) wurden sie allerdings wesentlich früher markiert.

Die ebenfalls unter aeroben Bedingungen durchgeführten Versuche der Serie 1a-1d erbrachten keine grundsätzlich anderen Ergebnisse. Wieder blieb in den Proben ohne Glucosezusatz (1a,1b) der Anteil der Asparaginsäure mit 16 % über lange Zeit konstant. Hervorzuheben ist, daß neben dem Alanin und der Phosphoglyzerinsäure auch das Glykokoll relativ stark markiert wurde. Ferner erfolgte besonders bei Zugabe von Glucose ein starker Einbau von $C^{14}O_2$ in die Pyrimidinnucleotide. Die Purinnucleotide waren im Gegensatz zur Versuchsserie 2 ebenfalls, wenn auch in weit geringerem Maße markiert. Das Citrullin enthielt bei beiden Versuchsserien nur in den Proben mit der längsten Fixierungszeit Aktivität.

Im Vergleich zu den Leerproben bewirkte die Glucosefütterung in den Proben 1c,1d und 2c eine intensivere Verteilung des C^{14} über den Stoffwechsel in Sekundärprodukte. Dies führte innerhalb vergleichbarer Fixierungszeiten zu stärkeren Veränderungen in der prozentualen Verteilung der Gesamtaktivität.

Bei den mit Stickstoff begasten Proben (Tab.32) ergab die Aufarbeitung der löslichen Fraktionen, daß nur wenige Substanzen C^{14} enthielten. Es wurden weder markierte Zitronensäure noch Nucleotide gefunden. Der prozentuale Anteil an der Gesamtaktivität betrug bei der Asparagin- und Fumarsäure nach 30 Sekunden (2g) 2.5 % bzw. 2.7 %, bei der Äpfelsäure und dem Glykokoll 6.0 % bzw. 5.1 %. Aus diesen Produkten war nach 10 Minuten (2k) die Radioaktivität bis auf Spuren verschwunden. Bei allen vier Proben gelangte der größte Teil des fixierten $C^{14}O_2$ in die Bernsteinsäure. Außerdem wurde noch die Milchsäure zunehmend markiert. Ihr Anteil an der Gesamtaktivität stieg von 1.8 % nach 30 Sekunden (2g) auf 11 % nach 30 Minuten (2l). (Vgl.d.a.Abb.18).

Serratia marcescenz.

Dieser Organismus wurde während der $C^{14}O_2$ -Fixierung keinen anaeroben Bedingungen ausgesetzt. Die Gesamtfixierungen (Tab.34) zeigen trotz des zu niedrigen Wertes bei Probe 2d einen wachsenden Einbau radioaktiven Kohlenstoffs in die unlöslichen Fraktionen. Nach 30 Minuten (2e) waren 26 % der Gesamtaktivität im unlöslichen Zellmaterial festgelegt. Die leichtflüchtige Fraktion (1a) enthielt nur sehr wenig Aktivität. Die Glucosefütterung (2c) bewirkte im Vergleich zur Leer-

Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. lpm	Lösl. %	Unlös. %	F _n /%	F _s /%
1a	10/+	826 996	99.03		0.45	0.52
1b	10/+	466 200	81	19	Tabelle 34. Wie Tab.6. Serratia marcescenz.	
1c	40/+	635 310	60	40		
2a	0.50	135 780	100	-		
2b	1	246 532	100	-		
2c	1/+	603 500	99	1.0		
2d	3	192 960	94	6.0		
2e	30	422 082	74	26		



Diagramm 8. Wie Diagramm 1. *Serratia marcescenz*.
(Versuchsserie 2, Tab. 35)

Vers.Nr.	2a	2b *	2d	2e	2c	1b	1c *
Verbindungen %	Inkubationszeit/min:					Hy	Hy
	0.50	1	3	30	1/+	10/+	40/+
Asp	8.7	8.7	8.8	7.7	2.0	29	27
Glu	1.9	2.4	7.3	2.0	6.4	17	18
Glutn	-	-	2.3	-	0.90	-	-
Gly	-	-	-	2.9	1.1	6.0	6.2
Ala	-	-	-	1.1	1.2	-	-
Cit	-	-	3.1	1.3	2.0	-	-
Pro	-	-	-	-	-	4.0	4.4
Meth	-	-	-	-	-	6.0	4.4
DAP	-	-	-	-	-	11	8.0
Cyst	-	-	-	-	-	-	2.3
Äpf	61	58	39	16	14	-	-
Fum	23	25	17	12	5.0	-	-
Bern	-	-	1.1	42	59	-	-
Zit	3.8	1.1	5.1	-	2.3	-	-
Glyzs	-	0.46	1.1	1.1	-	-	-
BTS	0.77	1.5	2.8	1.0	1.9	-	-
PJS/PEB	0.98	1.1	4.3	2.2	-	-	-
Nucl.	-	1.3	7.0	7.4	3.7	-	-
Uracil	-	-	-	-	-	23	18
Thymin	-	-	-	-	-	-	5.1
Adenin	-	-	-	-	-	-	3.3
Guanin	-	-	-	-	-	3.9	3.6
Sonst.	-	0.50	1.1	3.3	0.50	-	-

Tabelle 35. Wie Tab.7. *Serratia marcescenz.*

Hy = Hydrolysate des Unlöslichen.
(Wie Tab.10)

* = Vgl.d.Abb.19.

• = " " 20.

probe 2b eine beträchtliche Erhöhung der Fixierungsrate.

Dem Diagramm 8 und der Tabelle 35 läßt sich entnehmen, daß die Ergebnisse im Prinzip mit denen übereinstimmen, die bei der Aufarbeitung der löslichen Fraktionen von *A. aerogenes* erhalten wurden. So enthielten bei *S. marcescens* die Äpfelsäure und die mit ihr im Gleichgewicht stehende Fumarsäure nach 30 Sekunden (Tab. 35,2a) über 80 % der Gesamtaktivität (vgl.d.a.Abb.19). Der prozentuale Anteil der Asparaginsäure wies mit durchschnittlich 8.5 % über 30 Minuten keine Veränderung auf. Die Glutaminsäure war wie bei *A. aerogenes* nur zu einem geringen Prozentsatz markiert.

Von den Proben b und c der Versuchsserie 1 wurden nur die Rückstände untersucht. Die Hydrolysate (Tab.35,Hy 1b,1c) zeigen, daß mit der Asparagin- und Glutaminsäure relativ viel C^{14} in das Protein gelangte. Darüberhinaus verteilte sich das C^{14} auf die Diaminopimelinsäure, das Glykokoll, Methionin, Cystein, Prolin und die Spaltprodukte der Nucleinsäuren (vgl.d.Abb.20).

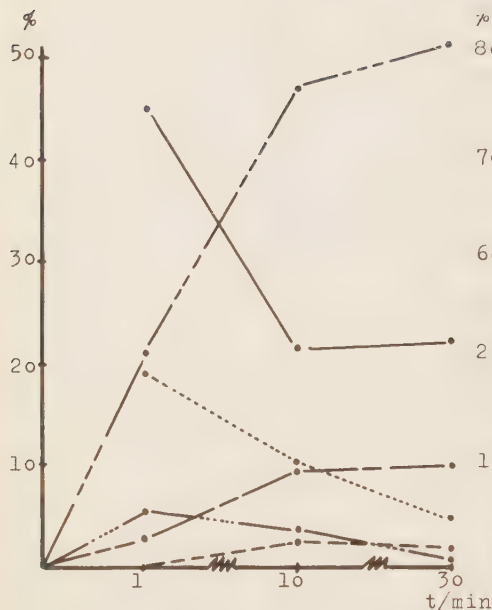
Escherichia coli.

Bei diesem Organismus wurden von sechs Proben einer Versuchsserie (Tab.36) drei mit Luft (1a-1c) und drei mit Stickstoff (1d - 1f) vor der Zugabe des $NaHC^{14}O_3$ durchspült. Alle Versuchsansätze enthielten Glucose als Substrat. Die Gesamtfixierungen zeigen trotz der verschiedenen Versuchsbedingungen keine wesentlichen Unterschiede. Die Zellen bauten in Abhängigkeit von der Fixierungszeit zunehmend C^{14} in die unlöslichen Substanzen ein.

Die Aufarbeitung der löslichen Fraktionen ergab, daß in der prozentualen Verteilung der markierten Produkte zwischen beiden Versuchsgruppen erhebliche Unterschiede bestehen.

Unter aeroben Verhältnissen (Diagramm 9, Tab.37, 1a-1c) befand sich zwar nach 1 Minute (1a) keine Aktivität in der Asparaginsäure, doch war die Zitronensäure mit 45 % fast doppelt so hoch markiert wie die Äpfel- und Fumarsäure mit zusammen 24 %. Die Glutamin- und α -Ketoglutaronsäure enthielten zusammen 22 % und nach 30 Minuten (1c) 51 % der Gesamtaktivität.(Vgl.d.Abb.21).

Obwohl die Mono-, Di- und Triphosphate nur zu einem geringen Prozentsatz markiert wurden, deuten das Auftreten radioaktiven Uridins und Adenosins in den löslichen Fraktionen (1a-1c) und der mit 38 % relativ hohe Anteil des Uracils (Adenin: 1% (1c)) im Hydrolysat des Unlöslichen der Proben 1b und 1c ((Hy) Tab.37) auf einen starken Umsatz dieser Substanzen hin. Im Protein fanden sich neben der Asparagin- und Glutamin-



--- Asp
 Äpf
 -.-.- Nucl.
 — Zit
 — Bern
 — Glu
 — Fum

Escherichia coli

Diagramm 9.

Wie Diagr. 1.

Diagramm 10.

Gasphase: Luft
 (Verss. 1, a-c, Tab. 37)

Gasphase: Stickstoff
 (Verss. 1, d-f, Tab. 37)

Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. Ipm	Losl. %	Unlös. %
1a	1/+	518 540	98	2.0
1b	10/+	822 940	90	10
1c	30/+	949 886	84	16
2a	1/+	580 560	98	2.0
2b	10/+	391 920	93	7.0
2c	30/+	673 992	79	21

Tabelle 36. Wie Tab. 6.

Escherichia coli.

1a-1c : Gasphase: Luft.

1d-1f : " : N₂

Vers.Nr.	1a	1b	1c*	1b	1c	2a	2b*	2c	2c
Verbindungen %	Inkubationszeit Hy					Inku'szeit/min Hy			
	1/+	1o/+	3o/+	1o/+	3o/+	1/+	1o/+	3o/+	3o/+
Asp	-	2.4	1.6	2o	23	-	-	1.3	34
Glu	14	28	6.4	23	2o	2.4	o.4o	o.99	32
Gly	-	1.8	-	-	-	-	-	-	-
Cit	1.8	1.8	1.2	-	-	-	-	-	-
Thre	-	-	-	-	-	-	-	-	1.8
Meth	-	-	-	5.o	12	-	-	-	8.9
DAP	-	-	-	12	5.o	-	-	-	6.5
Cyst	-	-	-	2.o	o.85	-	-	-	2.5
Äpf	19	1o	5.o	-	-	2o	8.9	4.8	-
Fum	5.5	3.1	o.71	-	-	8.9	7.2	2.5	-
Bern	2.6	2.9	1.2	-	-	6.o	75	76	-
Zit	45	21	22	-	-	1.4	1.4	1.7	-
α-KGS	8.1	19	45	-	-	2.2	5.4	3.5	-
Glyzs	o.71	o.62	o.5o	-	-	o.86	o.5o	-	-
PGS	-	-	-	-	-	2.2	-	-	-
Nucl.	o.89	3.9	5.o	-	-	-	1.1	2.2	-
UMP	-	-	o.85	-	-	-	-	o.4o	-
Uridin	1.9	5.4	3.7	-	-	-	-	2.o	-
Adenos.	o.5o	-	6.1	-	-	-	-	1.6	-
Uracil	-	-	-	38	38	-	-	-	14
Adenin	-	-	-	-	1.o	-	-	-	-
Sonst.	-	-	o.8o	-	-	2.o	-	3.o	-

Tabelle 37. Wie Tab.7. Escherichia coli.

1a-1c = Gasph.: Luft.

1d-1f = " : Stickstoff.

Hy 1b,1c,1f = Hydrolysate des
Unlöslichen. Wie Tab.1o.

* = Vgl.d.Abb.21.

• = " " 22.

säure markierte Diaminopimelinsäure, markiertes Methionin und Cystein.

Unter anaeroben Bedingungen waren im Protein zusätzlich das Threonin, sonst jedoch die gleichen Aminosäuren markiert (Tab.37, Hy 1f). Stark verminderte sich der Anteil des Uracils, so daß sich die Prozentsätze zugunsten der Aminosäuren verschoben.

Bei Sauerstoffentzug ging in den löslichen Fraktionen der prozentuale Anteil der Pyrimidin- und Purinnucleotide, der α -Ketoglutar-, Zitronen- und Glutaminsäure erheblich zurück. Ein starker Stoffumsatz erfolgte dagegen über die Äpfel- und Pumarsäure, denn bereits nach 1 Minute (1d) erschienen 60 % des fixierten C^{14} in der Bernsteinsäure (Tab.37, 1d-1f, Diagramm 1o, vgl.d.Abb.22).

Diskussion.

Anhand der Verteilung des C^{14} kann gesagt werden, daß die Fixierung des $C^{14}O_2$ bei allen drei Organismen über die C_3+C_1 -Addition, das Carbamylphosphat und die Aminoimidazolribonucleotid-Carboxylase erfolgt.

Im Gegensatz zu den bisher besprochenen Organismen scheint die Carboxylierung der Brenztraubensäure durch das Malic-enzym bei A.aerogenes und S.marcescenz die wesentliche Reaktion für die $C^{14}O_2$ -Fixierung zu sein. Dafür sprechen der anfangs prozentual hohe Anteil der Äpfelsäure und ihr negativer "Slope". Die Prozentsätze der Asparagin- und Zitronensäure sind dagegen vergleichsweise niedrig, bleiben über lange Zeit konstant oder steigen sogar leicht an. Beide Produkte erweisen sich damit als Sekundärprodukte.

Bei E.coli ist die Asparaginsäure kaum markiert, doch könnte der prozentual hohe Anteil der Zitronensäure bedeuten, daß neben dem Malat auch die Oxallessigsäure primär gebildet wird.

Von den löslichen C_3 -Verbindungen wiesen bei A.aerogenes vor allem das Alanin und die Phosphoglyzerinsäure eine relativ hohe Markierung auf. Die Reaktionen, die zur Bildung carboxylmarkierten Pyruvats führen, wurden bereits ausführlich beschrieben (s.d.S.55 ff).

Der bei allen drei Organismen zunehmende Einbau von C^{14} in die Proteinfraktion beweist, daß über den Zitronensäurezyklus ein starker Materialfluß in die Asparagin- und Glutaminsäure erfolgt. Der Zitronensäurezyklus ist bei A.aerogenes und E.coli vorhanden. Gilvarg und Davis, 1956, (108) konnten dies feststellen, als sie mit Hilfe von Mangelmutanten die Endoxydation der Brenztraubensäure untersuchten.

Unter anaeroben Bedingungen bei A.aerogenes und E.coli (S.marcescenz wurde nicht untersucht) wurde fast ausschließlich Bernsteinsäure

markiert. Folgende Erklärung bietet sich an. Der Sauerstoffentzug blockiert die Atmungskette und damit die oxydativen Schritte des Zitronensäurezyklus. Die durch CO_2 -Fixierung gebildete Äpfelsäure kann nicht mehr zu Oxalessigsäure dehydriert werden. Die bei der Glucose= dissimilation reduzierten Wasserstoffacceptoren werden durch die Hydrogenase oder über die unter Reduktion verlaufenden Stoffwechselreaktionen reoxydiert. So fixieren die Zellen zwar nach wie vor C^{14}O_2 über die mit NADPH gekoppelte Malic-Enzym-Reaktion, wandeln jedoch die Äpfelsäure über das Fumarat in Succinat um, wobei NADH verbraucht wird. Es muß jedoch bedacht werden, daß dieser Mechanismus quantitativ nur von untergeordneter Bedeutung ist, denn von den Organismen der Coli-Aerogenes-Gruppe ist bekannt, daß anaerob vor allem Essigsäure durch die oxydative Decarboxylierung der Brenztraubensäure gebildet wird.

Bei A.aerogenes gelangt auch unter Stickstoff Aktivität in die Carboxylgruppe des Pyruvats, das jedoch ausschließlich zu Milchsäure reduziert wird.

Bemerkenswert ist, daß sich auch unter aeroben Bedingungen in den löslichen Fraktionen von A.aerogenes (Tab.35,1) und S.marcescenz (Tab.35,2) im Laufe der Fixierungszeit markierte Bernsteinsäure anhäufte. Ihr prozentualer Anteil erhöhte sich schon nach kurzer Zeit beträchtlich, wenn Glucose gefüttert wurde. Möglicherweise ist der Elektronentransport über die Atmungskette durch die geringe Enzymkapazität oder durch den in den Fixierungsgefäßen ständig abnehmenden Sauerstoff-Partialdruck begrenzt. Die Organismen könnten gezwungen sein, einen Teil der Fumarsäure zu Bernsteinsäure zu reuozieren. Man könnte dies als aerobe "Bernsteinsäure-Gärung" bezeichnen.

Der Einfluß des Kohlendioxyds auf den Stoffwechsel von S.marcescenz wurde verschiedentlich untersucht. So konnten McLean et al. (109) feststellen, daß wachsende Zellen zehnmal mehr C^{14}O_2 fixierten als ruhende. Die Fixierung des Kohlendioxyds ließ sich auf 6.5 % des Maximalwertes herabsetzen, wenn man Asparagin, Arginin, Uracil, Adenin bzw. Guanin in optimalen Konzentrationen zufügte. Da die Synthese dieser Substanzen verschiedene Mechanismen der CO_2 -Fixierung voraussetzt, senkte jede einzelne von ihnen die Gesamtfixierung um einen definierten Prozentsatz. Das Asparagin wiederum ließ sich durch die Asparagin- und Glutaminsäure, sowie durch die Zwischenprodukte des Zitronensäurezyklus ersetzen. Green und Williams, 1959, (110) ließen S.marcescenz in einem definierten Medium in Gegenwart von C^{14}O_2 über 18 Stunden wachsen. Erhöhten sie beim Verschließen der Gefäße vorsorglich den Sauerstoffdruck, fanden sie keine Anhäufung der Intermediärprodukte

des Zitronensäurezyklus. Im anderen Falle führte der zunehmende Sauerstoffmangel zu einer Anreicherung der Zitronen-, Fumar-, Äpfel- und Bernsteinsäure. Von den Aminosäuren waren Asparagin- und Glutaminsäure, Citrullin und Arginin, Threonin, Methionin, Prolin, Lysin und Isoleucin markiert. Die Verfasser schließen aus diesen Ergebnissen, daß ein Zitronensäurezyklus vorhanden ist.

Bei E.coli prüften Abelson et al., 1952, (111) im Zusammenhang mit der $C^{14}O_2$ -Fixierung den Einbau von C^{14} in das Protein. Sie fanden markierte Asparagin- und Glutaminsäure, markiertes Arginin, Lysin, Prolin und Threonin. Daß die $C^{14}O_2$ -Fixierung zur Markierung der Purin- und Pyrimidinnucleotide führt, ist seit den Untersuchungen von Bolton et al., 1952, (112) bekannt.



Abbildung 17. Wie Abb.5.

Aerobacter aerogenes.

Fixierungszeit: 30 sec.

Gasphase: Luft.

Substrat: -

(Tab.33, Probe 2a).

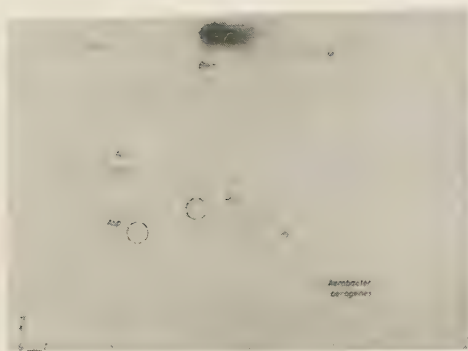


Abbildung 18. Wie Abb.5.

Aerobacter aerogenes.

Fixierungszeit: 30 sec.

Gasphase: Stickstoff.

Substrat: Glucose (0.1% E)

(Tab.32, Probe 2g).

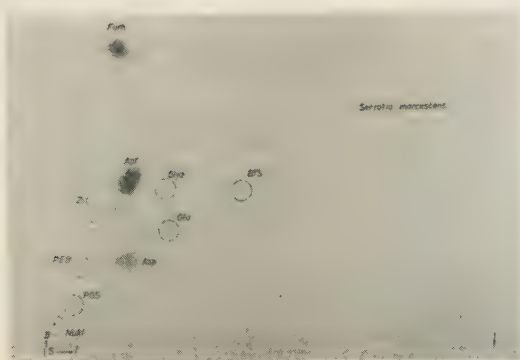


Abbildung 19. Wie Abb.5.

Serratia marcescenz.

Fixierungszeit: 1 min.

Gasphase: Luft.

Substrat: -

(Tab.35, Probe 2b).

Abbildung 20. Wie Abb.11.

Serratia marcescenz.
(Tab.35, Probe Hy 1c).



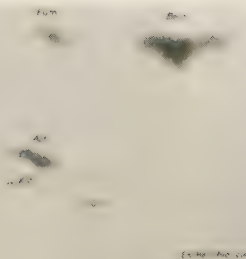
Abbildung 21. Wie Abb.5.

Escherichia coli.
Fixierungszeit: 30 min.
Gasphase: Luft.
Substrat: Glucose (0.1% E).
(Tab.37, Probe 1c).



Abbildung 22. Wie Abb.5.

Escherichia coli.
Fixierungszeit: 10 min.
Gasphase: Stickstoff.
Substrat: Glucose (0.1% E).
(Tab.37, Probe 2b).



5. Organismen mit Fixierung des $C^{14}O_2$ in Asparagin- und Bernsteinsäure als Folgeprodukte verschiedener Fixierungsmechanismen.

Mycobacterium phlei.

Nocardia rubra.

(Actinomycetales).

Beide Organismen fixierten in den jeweiligen Versuchsserien (Tab. 38,40) in Abhängigkeit von der Zeit zunehmend $C^{14}O_2$. Die Glucosefütterung führte in den meisten Fällen zu einer Verdünnung des $C^{14}O_2$ durch $C^{12}O_2$, denn die Gesamtfixierungen liegen im Vergleich zu den Leerproben teilweise erheblich niedriger. Die Substratgabe bewirkte vor allem im Verlauf relativ langer Fixierungszeiten (5 und 30 Minuten) über den erhöhten Stoffumsatz einen stärkeren Einbau markierter Substanzen in die unlöslichen Fraktionen. Die leichtflüchtigen Produkte enthielten einen unbedeutenden Prozentsatz an C^{14} .

Die Diagramme 11 und 12 zeigen übereinstimmend, daß der prozentuale Zuwachs an markierten C_5 -Verbindungen (Glutamin- und α -Ketoglutar-säure) auf Kosten des prozentualen Anteils der Asparagin- und Zitronensäure erfolgt, die sich damit als primäre Fixierungsprodukte der C_3+C_1 -Addition über die Oxalessäure erweisen. Der geringe prozentuale Anteil der Äpfelsäure macht die Teilnahme des Malic-Enzyms an den Carboxylierungsreaktionen unwahrscheinlich. Einen deutlich negativen "Slope" zeigen dagegen die überraschend hohen Prozentsätze der Bernsteinsäure (vgl.d.a.Abb.23.24). Bei *M.phlei* (Tab.43) war das Succinat bereits nach 1 Minute (2a) ohne Glucosefütterung mit 14 %, bei Substratgabe (2b) mit 26 % an der Gesamtaktivität beteiligt. *N.rubra* zeigt das gleiche Bild (Tab.44), doch ist hier das Verhältnis Leerprobe (2a) zu Probe mit Glucosefütterung (2b) 6.3 % zu 18 %.

Bei *M.phlei* (Tab.43) reicherte sich in den Proben der Versuchsserien 1 und 2 α -Ketoglutar-säure an. Sie wurde mit Ausnahme der Probe 2d zu einem nur geringen Prozentsatz in Glutaminsäure umgewandelt. Die Summe des Keto- und Aminosäureanteils ergab den schon anhand des Diagramms 11 erläuterten prozentualen Zuwachs an Aktivität im Verlauf der Fixierungszeit. In Versuchsserie 1 enthielt die Brenztraubensäure in allen vier Proben (1a-1d) ebenfalls relativ viel C^{14} , während der prozentuale Anteil des Alanins vergleichsweise gering war.

In den löslichen Fraktionen beider Organismen waren die Mono-, Di- und Triphosphate der Pyrimidin- und Purinnucleoside markiert. Bei *M.phlei* wurden die Nucleosiddiphosphate (auf den Chromatogrammen Mischfleck 3) durch Salzsäurehydrolyse ("7-Min.-Ph", s.Meth.S.28)

Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. Ipm	Lösl. %	Unlös. %
1a	5	1 610 040	91	9.0
1b	30	2 085 226	76	24
1c	5/+	743 418	81	19
1d	30/+	1 116 150	47	53
2a	1	953 040	97	3.0
2b	1/+	1 235 016	98	2.0
2c	3	1 444 668	93	7.0
2d	10	1 917 536	87	13
2e	40	3 307 770	81	19
3a	10	2 712 738	89	11
3b	40	2 711 720	66	34
3c	10	5 163 492	99.46	
			F _n /%	F _s /%
			0.27	0.27

Vers.Nr.	3a	3b
Verbin- dungen	Zeit/min	
	%	10 40
Asp	41	42
Glu	16	16
Gly	5.0	8.0
Ala	1.3	4.4
Pro	1.6	2.5
Meth	1.6	1.4
Leu	4.5	3.4
Val	0.92	2.0
DAP	2.4	3.0
Cyst	4.2	3.8
Uracil	20	13
Guanin	1.7	1.3

Tabelle 38. Wie Tab.6.

Mycobacterium phlei.

Tabelle 39. Wie Tab.10.

Mycobacterium phlei.

Hydrolysate des Unlös-
lichen der Verss.3,Tab.38.

in die Monophosphate umgewandelt. Nach der Dephosphorylierung mit 5'-Nucleotidase ergab sich, daß 78 % der Gesamtpulse dieser Produkte auf das Uridin (UDP) und 22 % auf das Guanin (GDP) entfielen.

Die Rückstände zweier Proben von M.phlei (Tab.39, 3a,b) und N.rubra (Tab.41,3a,3b) wurden hydrolysiert. Im Protein waren neben den Aminosäuren, deren Synthese über die Asparagin- und Glutaminsäure verläuft, auch Glykokoll, Alanin, Leucin und Valin markiert. Bei N. rubra (s.a. Abb.25) war der mit 13 % hohe Anteil des Glykokolls auffällig. Bei beiden Organismen enthielt das Uracil, bei M.phlei auch das Guanin C¹⁴.

Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. Ipm	Lösl. %	Unlös. %
1a	5	1 199 340	85	15
1b	30	3 179 960	67	33
1c	5/+	1 596 948	82	18
1d	30/+	2 606 976	54	46
2a	1	446 844	96	4.0
2b	1/+	438 480	95	5.0
2c	3	809 088	89	11
2d	10	1 567 804	81	19
2e	40	2 676 432	73	27
3a	10	2 005 104	84	16
3b	40	3 131 184	74	26
3c	10	3 399 044	98.20	
			F _n /%	F _s /%
			0.28	1.52

Vers.Nr	3a	3b *
Verbin= dungen %	Hy 10	Hy 40
Asp	44	41
Glu	10	13
Gly	13	13
Thre	3.6	3.0
Ala	1.0	1.5
Meth	2.8	6.7
Cyst	1.1	4.4
DAP	-	1.8
Val	1.6	1.3
Pro	1.4	2.4
Leu	2.5	2.9
Uracil	19	9.0

Tabelle 40. Wie Tab.6.
Nocardia rubra.

Tabelle 41. Wie Tab.10.
Nocardia rubra.

Hydrolysate des Unlös-
lichen der Verss.3, Tab.40.

* = Vgl.d.Abb.25.

Diskussion.

Wie bei der Beschreibung der Diagramme bereits hervorgehoben wurde, gehört neben der allerdings ungleich stärker markierten Asparagin- und Zitronensäure wahrscheinlich auch die Bernsteinsäure zu den primären Fixierungsprodukten. Für diese Vermutung sprechen die starke Abnahme ihres prozentualen Anteils im Laufe der Versuchszeit, sowie der prozentual geringe Anteil der Äpfel- und Fumarsäure. Von den heute bekannten CO₂-Fixierungsmechanismen bildet nur einer unmittelbar Bernsteinsäure. Er wird von der Propionyl-Carboxylase katalysiert. Gibson und Knight, 1961, (21) konnten zeigen, daß in Gegenwart von Propionyl-CoA, Mg⁺⁺ und ATP durch zellfreie Extrakte von *Rhodospirillum rubrum*

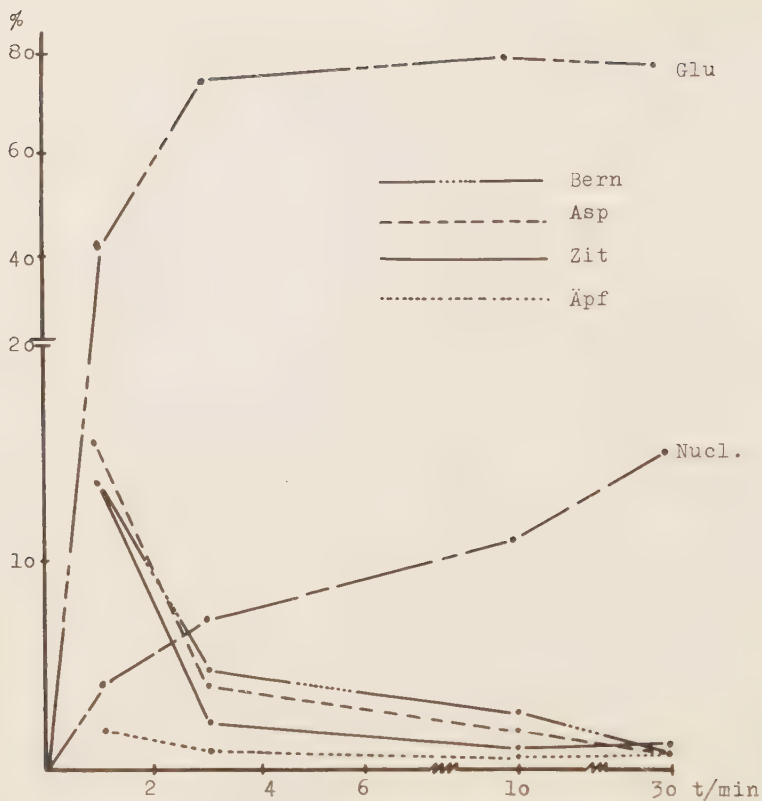


Diagramm 11. Wie Diagr.1. Mycobacterium phlei.
(Versuchsserie 2, Tab.43)

	Total- oxydat.	(α)HOOC -	NH CH-(CH ₂) ₂ -COOH
Spez.Akt. 1 μ m	752	3 761	0
Prozent. Verteilung des C ¹⁴	-	100	0

Tabelle 42. Mycobacterium phlei. Verteilung der Radioaktivität im Molekül der Glutaminsäure.

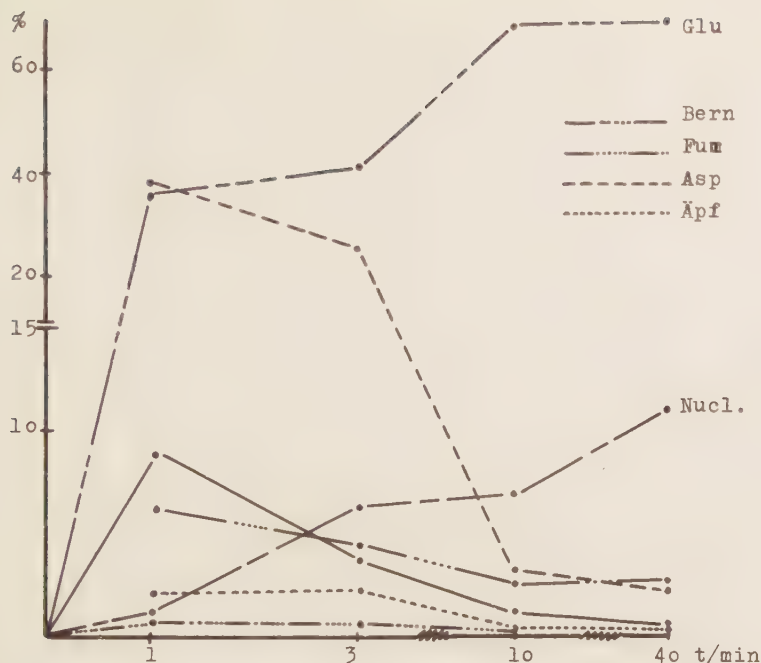


Diagramm 12. Wie Diagr.1. *Nocardia rubra*.
(Versuchsserie 2, Tab.44)

Methylmalonat und Succinat entsteht. Die gleiche Reaktion konnten sie auch bei *Mycobacterium smegmatis* beobachten (10). Bei *Nocardia coralina* wurde von Martin und Batt, 1957, (113) festgestellt, daß CO_2 die Oxydation der Propionsäure fördert. Zellen, die an Thiamin Mangel leiden, wandeln Propionat in Pyruvat um, wobei gleichzeitig eine Anhäufung von Bernsteinsäure beobachtet wurde. Die Verwendung von 3-C^{14} -Propionat zeigte, daß die Propionsäure auf zwei Wegen zum Pyruvat oxydiert werden kann, von denen nur einer über ein symmetrisches C_4 -Zwischenprodukt verläuft. Die Verfasser vermuten Bernsteinsäure.

Die Wirksamkeit der Propionyl-Carboxylase-Reaktion wurde in den geschilderten Arbeiten mit Propionsäure bzw. Propionyl-CoA als Substrat geprüft. In den hier vorliegenden Untersuchungen wurde die primäre Bildung der Bernsteinsäure jedoch die endogene Quelle dieser C_3 -Körper voraussetzen. In diesem Zusammenhang sind die Untersuchungen von Holzer et al., 1963, (114) interessant. In der kürzlich veröffentlichten

Vers.Nr.	1a	1b	1c	1d	2a	2c	2d	2e	2b
Verbindungen %	Inkubationszeit / min								
	5	30	5/+	30/+	1 *	3	10 •	40	1/+
Asp	7.5	2.6	2.4	1.6	16	3.9	1.6	0.54	12
Glu	6.4	4.2	3.5	8.1	30	2.3	75	2.6	0.98
Glutn	-	0.21	-	-	-	-	1.2	-	-
Gly x	0.67	0.58	0.48	0.44	2.2	1.0	1.2	0.25	1.7
Ala	1.1	0.44	0.31	0.29	2.2	2.2	0.32	0.26	1.4
Thre	0.83	0.43	0.74	0.76	0.50	0.55	0.38	0.23	0.89
Cit	-	-	-	-	-	-	1.3	0.15	-
Äpf	0.86	0.16	0.55	-	1.9	0.94	0.24	0.24	3.5
Fum	0.37	-	-	-	0.45	0.37	0.75	0.42	1.3
Bern	0.38	-	1.3	-	14	4.5	2.4	0.41	26
Zit	2.4	0.69	1.2	0.86	14	2.4	0.61	0.96	15
α-KGS	62	76	80	73	12	72	0.83	72	33
BTS	8.5	4.3	5.2	4.4	-	0.60	0.74	2.5	-
PGC •	0.30	0.35	-	-	-	0.43	0.32	0.37	0.23
1	3.8	2.2	0.95	2.5	2.6	4.2	0.7	9.3	2.8
2	2.0	2.6	0.85	2.5	-	2.1	2.2	4.8	-
3	0.60	-	0.62	1.6	0.51	0.42	0.80	-	-
UMP	0.57	1.0	0.45	1.6	0.51	0.24	-	-	0.29
AMP !!!	0.51	1.0	0.54	0.20	0.18	0.36	2.0	1.2	0.14
IMP	-	-	-	-	0.84	0.37	-	-	0.46
Sonst.	1.2	3.3	1.0	2.2	1.5	1.2	1.4	4.0	-

Tabelle 43. Wie Tab.7. *Mycobacterium phlei*.

x = Enthält Serin (< 30 %)

• = " FEB

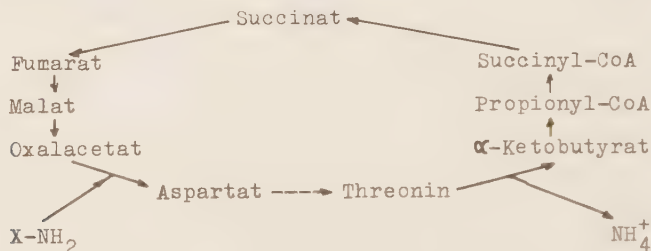
* = Vgl.a.Abb.23.

• = " " 24.

Vers.Nr.	1a	1b	1c	1d	2a	2c	2d	2e	2b
Verbindungen %	Inkubationszeit / min								
	5	30	5/+	30/+	1	3	10	40	1/+
Asp	3.5	3.0	3.0	1.1	38	26	3.1	2.2	24
Glu	77	75	79	76	36	20	68	69	36
Glutn	0.41	1.3	0.35	0.57	-	0.75	0.47	0.49	-
Gly	1.6	0.97	1.0	1.2	1.0	2.0	0.57	0.28	1.0
Ala	0.63	1.1	0.63	0.48	1.4	4.8	4.0	3.5	1.0
Thre	0.93	0.58	0.77	0.39	0.34	0.57	0.44	0.60	0.33
Cit	3.4	5.1	2.2	3.1	1.0	-	0.53	0.60	-
Pro/Val	-	-	-	-	0.85	2.5	3.7	2.5	0.82
Tyr	-	-	-	0.36	-	-	-	-	-
Äpf	-	-	0.23	0.13	2.1	2.2	0.25	0.23	4.2
Fum	-	-	0.10	-	0.77	0.61	0.18	-	1.4
Bern	1.6	0.76	1.1	0.72	6.3	4.3	2.7	2.8	18
Zit	1.8	0.58	2.3	1.9	8.9	3.8	1.2	0.73	4.8
Glyzs	0.86	0.81	1.3	1.5	0.17	0.60	-	0.32	0.25
BTS	-	-	-	-	-	0.45	0.26	0.19	-
α-KGS	-	-	-	-	0.38	20	0.19	-	0.38
PGS	-	-	-	-	0.34	0.45	0.30	0.19	-
1	0.50	0.60	2.8	3.0	-	1.4	2.1	2.4	0.93
2	2.3	2.8	1.1	2.2	-	2.2	3.0	5.6	1.0
3	1.2	1.8	1.7	2.9	-	0.66	1.4	1.6	0.11
UMP	0.62	0.44	-	-	1.1	1.1	0.16	0.66	0.61
AMP	0.70	0.33	0.92	0.48	-	0.87	0.47	0.37	1.2
IMP	-	-	-	-	-	-	-	-	0.37
Sacch	-	-	0.52	3.5	-	-	-	-	-
Sonst.	3.0	5.0	0.50	0.50	1.4	4.6	7.0	5.5	3.5

Tabelle 44. Wie Tab.7. *Nocardia rubra*.

Arbeit werden Aktivitätsänderungen der Threonin-Desaminase (1-Threonin-Hydrolyase) beschrieben, die der Regulation des NH_4^+ -Stoffwechsels durch Anpassung an eine veränderte Zusammensetzung des Nährmediums dienen. Die Verfasser erläutern anhand des nachstehenden Schemas den sogenannten "Threonin-Zyklus":



Es kann gezeigt werden, daß die durch die Threonin-Desaminase katalysierte NH_4^+ -Gewinnung immer dann eine besondere Rolle spielt, wenn NH_4^+ im Nährmedium fehlt und von anderen Stickstoffquellen geliefert werden muß. Das bei der Desaminierung entstehende α -Ketobutyrat kann zu Isoleucin umgesetzt oder oxydativ zu Propionyl-CoA decarboxyliert werden. Bei M.phlei und N.rubra wäre auf diesem Wege ein erhöhtes Angebot an Propionyl-CoA als Acceptorsubstanz durchaus denkbar, da die gewaschenen Zellen an Stickstoff Mangel leiden. Markiertes Threonin wurde in den löslichen Fraktionen immer gefunden.

Die Bildung der markierten Bernsteinsäure über den Glyoxylat-Shunt ist im vorliegenden Fall unwahrscheinlich, da dies einen prozentual hohen Anteil der in der α -Carboxylgruppe markierten Oxallessigsäure voraussetzen würde. Die nur schwache Markierung der Äpfel- und Fumarsäure lassen aber einen starken Austausch der α - und β -Carboxylgruppe nicht erwarten. Außerdem müßte über die Glyoxylsäure eine zumindest ebenso starke Markierung des Glykokolls (Aminierung des C_2 -Körpers) bzw. der Äpfelsäure (Kondensation des Glyoxylats mit Acetyl-CoA mittels Malat-Synthetase) zu finden sein. Neben dem Malat enthält jedoch auch das Glykokoll vergleichsweise wenig C^{14} . Das Auftreten relativ gut markierter C_3 -Verbindungen läßt den Schluß zu, daß seine Synthese via Phosphohydroxybrenztraubensäure - Serin verläuft.

Bei M.phlei und N.rubra stand der raschen Abnahme des prozentualen Anteils der Bernsteinsäure eine deutliche Aktivitätszunahme in der α -Ketoglutar- bzw. Glutaminsäure gegenüber. Bei der Äpfel- und Fumarsäure zeigte sich keine Erhöhung der Prozentsätze, was auf einen Umsatz markierten Materials hingewiesen hätte. Es lag daher nahe,

neben der Verteilung des C^{14} über den Zitronensäurezyklus an die Möglichkeit einer Umkehrung der oxydativen Decarboxylierung der α -Ketoglutarinsäure zu denken. Wie bereits eingangs beschrieben, berichten Jantino (58), sowie Goldberg und Samadi (59) von der Carboxylierung der Bernsteinsäure zu α -Ketoglutarinsäure. Da das Succinat als symmetrische Verbindung in beiden Carboxylgruppen markiert ist, müßte im Fall einer solchen Reaktion das γ -C-Atom der α -Ketoglutarinsäure bzw. der Glutaminsäure, sowie das der α -Carboxylgruppe benachbarte C-Atom (C_2) erheblich markiert sein. Entstehen die genannten Produkte über die regulären Reaktionen des Zitronensäurezyklus, enthält ausschließlich die α -Carboxylgruppe Aktivität (s.d.S.56). Wie aus Tabelle 42 zu ersehen ist, ergab der Abbau der aus Probe 2d von M.phlei stammenden Glutaminsäure, daß sich die spezifische Aktivität des Kohlenstoffs der α -Carboxylgruppe zu der der Totaloxydation wie 5 : 1 verhält. Daraus folgt, daß das C^{14} zu 100 % in der α -Carboxylgruppe enthalten war. Demzufolge kann ausgeschlossen werden, daß bei diesem Organismus α -Ketoglutarinsäure durch Carboxylierung der Bernsteinsäure gebildet wird.

Die α -Ketoglutarinsäure trat normalerweise auf den Chromatogrammen wenig oder überhaupt nicht in Erscheinung, da sie als Intermediärprodukt des Zitronensäurezyklus und der Glutaminsäuresynthese nur einen kleinen Pool besitzt. Die bei M.phlei (Tab.43), E.coli (Tab.37, 1a-1c) und einer Probe von N.rubra (Tab.44,2d) beobachtete Anhäufung stellt eine Besonderheit dar. Möglicherweise beeinflussen Veränderungen im Stickstoffhaushalt den Stoffwechsel der Ketosäuren in besonderer Weise. Bei M.phlei wurde nämlich in Versuchsserie 1 die Umwandlung der Brenztraubensäure in Alanin ebenfalls gehemmt. Dagegen zeigte sich in Versuchsserie 2 (Probe 2a und 2d), daß die α -Ketoglutarinsäure unter Anreicherung von Glutaminsäure aminiert werden kann.



Abbildung 23. Wie Abb.5.

Mycobacterium phlei.

Fixierungszeit: 1 min.

Gasphase: Luft.

Substrat: -

(Tab.43, Probe 2a).

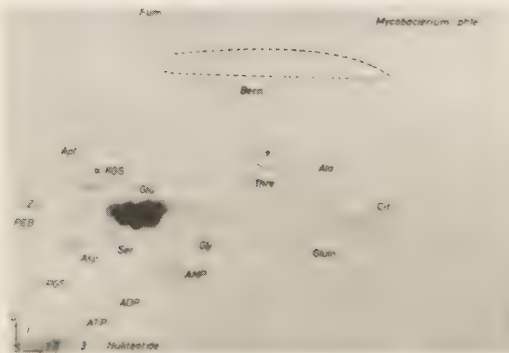


Abbildung 24. wie Abb.5.

Mycobacterium phlei.

Fixierungszeit: 10 min.

Gasphase: Luft.

Substrat: -

(Tab.43, Probe 2d).

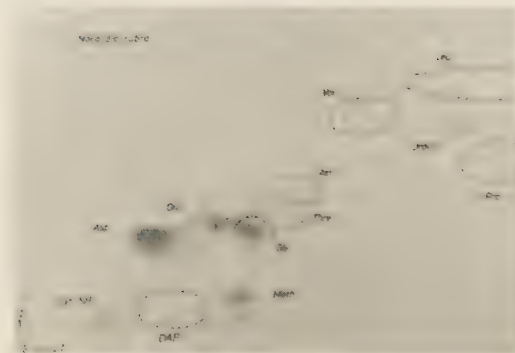


Abbildung 25. Wie Abb.11.

Nocardia rubra.

(Tab.41, Probe 3b)

II. Hefen.

Rhodotorula glutinis.

Candida crusei.

Candida spec.

Saccharomyces carlsbergensis.

Rhodotorula glutinis.

In drei Versuchsserien (Tab.45,1a-1d, 2a-2e, 3a-3c) fixierte diese strikt aerobe Hefe in Abhängigkeit von der Zeit zunehmend $C^{14}O_2$. Nach langen Fixierungszeiten machten sich allerdings starke Depressionen bei den Fixierungsraten bemerkbar. Die Glucosefütterung bewirkte nach kurzen Zeiten eine deutliche Erhöhung der Gesamtfixierung (1c, 2b). Nach 30 Minuten (1d) übte bereits die Verdünnung des $C^{14}O_2$ durch $C^{12}O_2$ einen starken Einfluß aus.

Die Werte des Diagramms 13 sind der Versuchsserie 2 in Tabelle 46 entnommen. Die Markierung der Äpfelsäure fällt im Verlauf von 30 Minuten von 42 % auf 9.5 % ab. Der prozentuale Anteil der mit dem Malat im Gleichgewicht stehenden Fumarsäure nimmt ebenfalls ab, während er bei der Asparaginsäure nach 3 Minuten (2c) ein Maximum zeigt. Wahrscheinlich verläuft die Synthese der C_4 -Körper über die Reaktion des Malic-Enzyms. Es läßt sich zwar nicht ausschließen, daß über andere Carboxylierungsmechanismen der C_3+C_1 -Addition $C^{14}O_2$ direkt in die Oxalessigsäure eingebaut wird, doch muß der Umsatz markierter Substanz über die Malic-Dehydrogenase erheblich stärker sein, damit sich die für Sekundärprodukte typischen Veränderungen im prozentualen Anteil der Asparaginsäure überhaupt abzeichnen.

Im Verlauf der Fixierungszeit wird das C^{14} über den Zitronensäurezyklus verteilt. Die Glutaminsäure als spätes sekundäres Fixierungsprodukt wird zunehmend markiert. In das Succinat gelangt bereits nach kurzer Zeit Aktivität. Wie bei A.aerogenes und E.coli findet möglicherweise auch bei diesem Organismus eine Bernsteinsäure-Gärung statt.

Über das Carbamylphosphat und die Aminoimidazolribonucleotid-Carboxylase wird zunehmend C^{14} in die Nucleotide eingebaut. Wie aus Tabelle 46 ersichtlich ist, setzt sich die Summe dieser Substanzen aus den Mono-, Di- und Triphosphaten zusammen (1a,1b,2a-2e,3b-3c). Die enzymatische Dephosphorylierung der in die Monophosphate umgewandelten Nucleotidtriphosphate ergab ausschließlich radioaktives Uridin. Der "UDPG-Fleck" (Chromatogramm = Mischfleck 2, vgl.d.Abb.26) wurde ebenfalls genauer untersucht. Auch er enthielt nur markiertes Uridin. Im Zuckeranteil wurde keine Aktivität gefunden.

Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. Ipm	Lösl. %	Unlös %
1a	5	486 534	86	14
1b	30	1 856 484	88	12
1c	5/+	830 772	89	11
1d	30/+	872 904	88	12
2a	1	909 016	98	2.0
2b	1/+	1 272 600	98	2.0
2c	3	1 270 890	97	3.0
2d	10	3 295 620	95	5.0
2e	40	3 690 860	91	9.0
3a	0.25	209 502	94	6.0
3b	10	2 305 444	89	11
3c	40	2 304 552	73	27

Tabelle 45. Wie Tab.6.

Rhodotorula
glutinis.

Von den Sekundärprodukten sind noch die Phosphoglyzerinsäure, das Glykokoll und Serin, das Alanin sowie die Glyzerin- und Glykolsäure zu erwähnen. Besonders auffällig war die starke Markierung des Alanins.

Im Prinzip zeigte sich in allen Versuchsserien eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse. Die Glucosefütterung (Tab.47, 2b,1c,1d) bewirkte einen höheren Stoffumsatz, daher veränderten sich die prozentualen Anteile der markierten Produkte gegenüber den Leerproben (ohne Substrat) dahingehend, daß sie Werten entsprachen, die bei gewaschenen Zellen ohne Glucosezusatz erst nach längerer Fixierungszeit gefunden wurden.

Das Protein der Proben 3b und 3c wurde hydrolysiert, nachdem zuvor die Nucleinsäuren abgetrennt worden waren. Von den Aminosäuren waren in der Reihenfolge ihres prozentualen Anteils Asparaginsäure, Methionin, Glutaminsäure, Threonin, Prolin, Valin, Leucin und Alanin markiert (Tab.48).

Die Spaltung der RNS und DNS hatte ergeben, daß die Pyrimidinbasen zu ungefähr 70 % und die Purinbasen zu 30 % an der Gesamtaktivität beteiligt waren. Dieser Befund steht im Einklang mit der Beobachtung

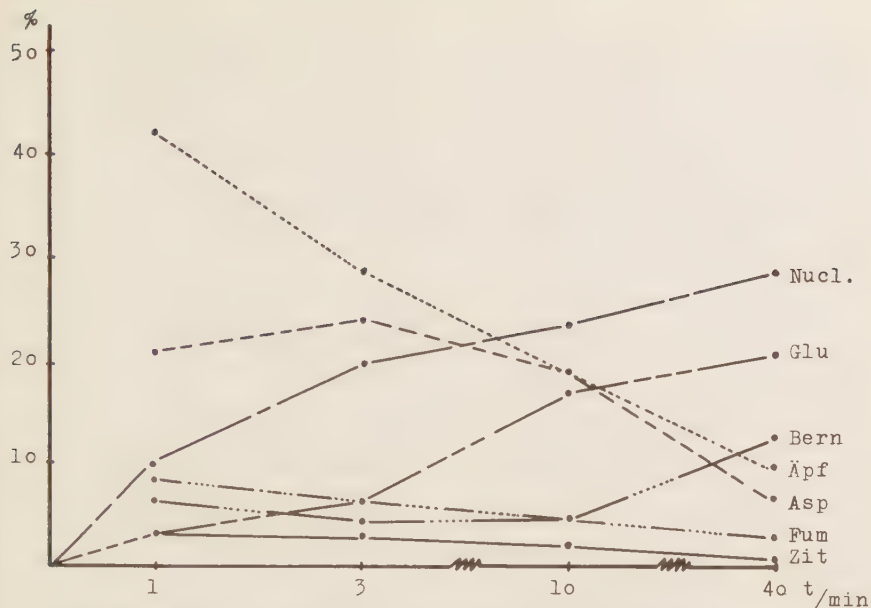


Diagramm 13. Wie Diagr.1. *Rhodotorula glutinis*.
(Versuchsserie 2, Tab.46)

daß auch in den löslichen Fraktionen das Uridin und Uracil sehr stark markiert waren. Im Vergleich zu den Purinverbindungen überwog hier eindeutig die Synthese der Pyrimidinnucleotide. Die Abbildungen 27 und 28 zeigen die Verteilung der markierten, löslichen Produkte der Probe 2d (Tab.46) auf Chromatogrammen, die in verschiedenen Laufmittelsystemen entwickelt wurden.

Candida crusei und Candida spec.

Vom Genus *Candida* wurden für die Untersuchungen *Candida crusei* und ein weiterer Stamm verwendet, der Fett spaltete, jedoch nicht genauer bestimmt wurde.

Beide Organismen bauten in Abhängigkeit von der Fixierungszeit zunehmend C^{14} in die Produkte der löslichen Fraktionen ein (Tab.49, 2a-2d, 3a-3d). Die Glucosefütterung bewirkte bei *C.spec.* (3c, 3d) eine Erhöhung der Fixierungsraten. Die Rückstände enthielten wenig Radioaktivität, desgleichen die Fraktion der Neutralstoffe (F_n) und der Säuren (F_s) im Leichtflüchtigen bei *C.crusei* (Tab.49, 1a).

Vers.Nr.	1a	1b	2a *	2c	2d •	2e	3a	3b	3c
Verbindungen %	Inkubationszeit / min								
	5	30	1	3	10	40	0.25	10	40
Asp	25	13	21	24	19	6.8	19	19	9.8
Glu	8.9	11	3.0	5.4	16	19	0.56	18	29
Glutn	0.90	2.5	-	0.40	0.98	1.9	-	1.1	4.2
Gly •	6.0	1.3	1.1	1.5	2.6	3.7	-	2.0	6.9
Ala	0.28	0.26	0.77	1.8	6.4	9.8	-	2.8	2.9
Cit	-	-	-	-	-	0.18	-	0.28	0.35
Arg	-	-	-	-	-	0.34	-	-	-
Äpf	13	2.1	42	29	17	9.5	59	18	5.1
Fum	2.0	0.54	8.6	6.4	4.7	2.8	8.1	4.8	1.5
Bern	1.2	0.98	6.3	4.5	4.7	13	5.3	5.2	1.3
Zit	0.81	0.68	3.7	3.0	2.0	0.40	8.7	3.4	1.6
α-KGS	-	-	0.44	0.22	0.24	-	-	-	-
Glyzs	0.23	0.27	0.23	0.24	0.24	0.18	-	0.24	0.38
Glyks	-	0.25	-	-	0.36	0.62	-	0.32	0.30
BTS	-	-	-	0.65	0.75	0.35	-	0.22	0.36
PGS	0.55	-	0.98	0.79	0.60	0.18	-	0.60	-
1	1.1	1.8	2.3	1.8	1.3	1.7	-	9.3	7.6
2	13	14	2.3	11	11	5.3	-	5.2	10
3	22	48	0.71	2.3	3.5	2.9	-	2.8	3.6
UMP	0.90	0.70	1.3	1.5	1.4	1.9	-	2.3	1.8
AMP'''	1.3	0.95	0.61	1.0	1.8	2.2	-	1.1	0.70
IMP	-	-	0.66	0.62	-	-	-	1.0	5.7
Uridin	-	0.31	1.4	0.95	2.0	3.9	-	1.2	3.5
Uracil	-	0.50	-	0.58	2.7	11	-	-	-
Sonst.	2.8	0.90	2.3	2.4	0.50	2.3	-	1.2	3.5

Tabelle 46. Wie Tab.7. *Rhodotorula glutinis*.

• = Enthält Serin (< 10%)

* = S.d.Abb.26.

• = " " 27.

Vers.Nr.	2b	1c	1d
Verbindungen	Inkub'tszeit/min		
%	1/+	5/+	30/+
Asp	25	15	23
Glu	4.5	3.1	9.4
Glutn	0.44	2.9	4.2
Gly	1.4	1.8	1.3
Ala	0.56	0.70	0.43
Cit	-	0.28	0.35
Apf	37	10	3.7
Fum	8.1	1.9	0.70
Bern	3.7	2.3	0.43
Zit	5.5	2.4	0.82
Glyzs	0.28	0.34	0.61
PGS	0.72	-	-
1	1.8	1.8	1.4
2	5.0	8.4	17
3	1.1	18	36
UMr	1.1	0.83	0.65
AMP !!!	0.37	0.39	0.36
IMP	0.41	-	-
Uridin	0.36	0.89	0.37
Uracil	-	0.45	-
Sonst.	2.7	0.70	-

Vers.Nr	3b	3c
Verbindungen	Zeit/min	
%	10	40
Asp	66	65
Glu	6.1	7.5
Thre	4.7	3.7
Ala	-	1.1
Meth	20	14
Pro	-	3.5
Val	2.0	2.4
Leu	1.7	2.7

Tabelle 48. Wie Tab.10.

Rhodotorula
glutinis.

Proteinhydrolysate
von Proben der Ver=
suchsserie 3,Tab.46.

Tabelle 47. Wie Tab.7.

Rhodotorula glutinis.

Die in den Tabellen 50 und 51 aufgeführten Werte zeigen, daß die prozentuale Verteilung der markierten Produkte in den Fraktionen von Organismus zu Organismus nicht entfernt vergleichbar waren.

Bei C.crusei (Tab.50) enthielt die Asparaginsäure noch nach 30 Minuten (2d) über 70 % der Gesamtaktivität. Der prozentuale Anteil der Äpfelsäure war nur gering und nahm im Verlauf von 30 Sekunden von

Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. Ipm	Lösl. %	Unlös. %	F _n /%	F _s /%
1a	10	4 014 148	99.20		0.40	0.40
2a	0.25	49 800	96	4.0	Tabelle 49. Wie Tab.6. 1a,2a-2d = Candida crusei. 3a-3d = Candida spec.	
2b	0.50	112 730	98	2.0		
2c	2	275 488	99	1.0		
2d	30	709 656	93	7.0		
3a	5	232 328	97	3.0		
3b	30	350 240	94	6.0		
3c	5/+	461 384	98	2.0		
3d	30/+	522 450	96	4.0		

6.4 % (2a) auf 8.1 % (2b) zu, bevor er in den folgenden 30 Minuten (2d) auf 1.7 % abfiel. Etwas C¹⁴ gelangte nach 2 Minuten (2c) in die Fumar- und Bernsteinsäure (vgl.d.a.Abb.29).

Die Bildung der C₄-Säuren erfolgte zumindest überwiegend über Oxal-essigsäure. Da markierte C₃-Verbindungen fehlen, läßt der zunehmende, relativ hohe prozentuale Anteil des Glykokolls dessen Entstehung über den Glyoxylat-Shunt vermuten. Für die C₄+C₂-Spaltung der Isozitronensäure sprechen ferner das Maximum im Äpfelsäureanteil nach 30 Sekunden (2b), was auf eine C₂+C₂-Kondensation durch die Malat-Synthetase hindeutet, und die Tatsache, daß in die Glutaminsäure nur wenig Aktivität gelangte, obwohl das Citrat nach 15 Sekunden (2a) bereits 8.9 %, nach 30 Minuten (2d) dagegen nur mehr 2.3 % der Gesamtaktivität aufwies. Da außer in Probe 2c (0.49%) kein meßbarer Austausch des C¹⁴ über die Fumarsäure erfolgte, war mit dem Auftreten nennenswert markierter Bernsteinsäure nicht zu rechnen.

Über das Carbamylphosphat wurden die Pyrimidinnucleotide und das Citrullin markiert, über die Aminoimidazolribonucleotid-Carboxylase nach längerer Zeit das AMP.

Bei Candida spec. (Tab.51) erfolgte der Einbau des C¹⁴O₂ mit hoher Wahrscheinlichkeit über das Malic-Enzym, denn die Äpfelsäure wies noch nach einer Fixierungszeit von fünf Minuten (3a) über 42 % der Gesamtaktivität auf. In der Probe mit Glucose lag der Prozentsatz mit 52 %

Tabelle 50.

Vers.Nr.	2a	2b	* 2c	2d
Verbindungen	Inkubationszeit/min			
	%	0.25	0.50	2 30
Asp	82	70	79	74
Aspn	-	-	-	-
Glu	-	-	2.0	5.0
Glutn	-	-	-	0.16
Gly	1.0	1.2	5.2	6.0
Ala	-	-	-	0.84
Thre	-	-	-	0.92
Cit	1.7	2.0	2.2	0.23
Arg	-	-	-	-
Meth	-	-	-	1.1
Äpf	6.4	8.1	3.0	1.7
Fum	-	-	0.49	0.36
Bern	-	-	0.69	-
Zit	8.9	7.0	2.2	2.3
Nucl.	-	5.1	2.8	3.5
UMP	-	1.7	1.2	1.5
AMP	-	-	-	1.2
Sonst.	-	4.9	1.2	1.2

Tabelle 51.

Vers.Nr.	3a	3b	3c	3d
Verbindungen	Inkubationszeit/min			
	%	5	30	5/+ 30/+
Asp	13	12	11	14
Aspn	-	1.3	0.50	0.86
Glu	4.9	6.0	2.3	6.1
Glutn	-	1.7	-	1.6
Gly	1.2	1.2	1.2	1.5
Ala	1.1	1.5	0.46	1.5
Cit	1.5	1.4	0.74	0.86
Arg	-	0.45	-	0.50
Äpf	42	23	52	25
Fum	7.7	4.5	11	4.9
Bern	15	32	10	30
Zit	0.77	0.77	1.1	1.0
PEB	1.0	1.3	1.5	0.25
1	3.0	2.2	1.2	2.4
2	1.5	2.2	1.2	2.0
3	5.7	6.6	3.9	7.1
UMP	1.2	0.83	0.86	-
Sonst.	0.30	2.0	1.0	0.45

Nukleotide	1/2	3
UTP	73	-
ATP	17	-
THPG?	10	-
UDP	-	88
ADP	-	5.5
GDP	-	6.5

Tab.50. Wie Tab.7. *Candida crusei*.

• = Enthält Serin (> 10 %).

* = Vgl.d.Abb.29.

Tab.51. Wie Tab.7. *Candida spec.*

• = Enthält Serin (> 10 %).

Tabelle 52. *Candida spec.*

Prozentualer Anteil der Pyrimidin- und Purinnukleotide in den Gemischen der Tri-(1), UDPG-(2) und Diphosphatregionen(3) der Chromatogramme.

(3c) sogar noch höher. Im Verlauf von 30 Minuten nahm der prozentuale Anteil in den vergleichbaren Versuchsansätzen (3b,3d) um die Hälfte ab, während weder die Asparagin- noch die Zitronensäure einen Abfall zeigten. Die Anhäufung markierter Bernsteinsäure erfolgt möglicherweise über die bereits beschriebene Bernsteinsäure-Gärung.

Über das Carbamylphosphat wurden nicht nur die verschiedenen Pyrimidinnucleotide synthetisiert, sondern auch das Citrullin und sein unmittelbares Folgeprodukt Arginin. Markierte Purinverbindungen wurden auf den Chromatogrammen nicht gefunden, doch bestand die Möglichkeit, daß sie den Pyrimidinphosphaten beigemischt waren. Daher wurden die Tri- und Diphosphatregionen (Mischfleck 1,2 und 3) der Chromatogramme eluiert und die markierten Produkte identifiziert (vgl.d. Meth.S.28). Den markierten Nucleosiden nach zu schließen, enthielten in den löslichen Fraktionen unter den Nucleotiden vorwiegend UTP, UDPG und UDP C^{14} (Tab.52). Ferner wurde nach der enzymatischen Abspaltung der Monophosphate radioaktives Thymidin gefunden. Möglicherweise hatte ursprünglich Thymidindiphosphat-Glucose vorgelegen. Der Anteil des ATP mit 17 % und des ADP, GDP mit 12 % war recht bemerkenswert.

Saccharomyces carlsbergensis.

Die unter anaeroben Bedingungen gewachsenen Zellen von S.carlsbergensis wurden geerntet, gewaschen und in Versuchsserie 1 (Tab.53, 1a-1d) auf vier Ansätze verteilt, von denen zwei Glucose als Substrat enthielten. Alle Zellsuspensionen wurden vor der $C^{14}O_2$ -Fixierung mit Luft durchspült.

Die Gesamtfixierungen zeigen in Abhängigkeit von der Zeit eine Zunahme des $C^{14}O_2$ -Einbaus. Die Glucosefütterung (1d,1c) bewirkte gegenüber den Leerproben (1a,1b) eine Erhöhung der Fixierungsraten. Der prozentuale Anteil der flüchtigen Fraktion an der Gesamtaktivität betrug im Versuchsansatz 2a lediglich 0.42 %.

Bei den löslichen, nicht-flüchtigen Produkten (Tab.54) zeigten nur die prozentualen Anteile der Asparagin- und Äpfelsäure in Abhängigkeit von der Fixierungszeit die typischen Merkmale primärer Fixierungsprodukte. Die relativ hohen Prozentsätze der beiden C_4 -Verbindungen lassen darauf schließen, daß über die C_3+C_1 -Addition sowohl Oxallessigsäure als auch Äpfelsäure (Malic-Enzym) unmittelbar gebildet wurden. Das C^{14} wurde über den Zitronensäurezyklus verteilt und reicherte sich in der Glutaminsäure an. Ferner gelangte es nach Spaltung der "doppelt" markierten Äpfel- bzw. Oxallessigsäure, möglicherweise auch über den

Vers.Nr.	1a	1b	1c *	1d
Verbindungen	Inkubationszeit/min			
%	5	30	5/+	30/+
Asp	48	24	52	25
Aspn	2.7	2.1	0.71	2.0
Glu	13	42	10	37
Glutn	0.35	1.8	-	2.1
Gly	0.57	0.57	0.47	1.5
Ala	0.25	1.0	0.15	1.4
Cit	0.96	0.65	1.1	1.3
Arg	0.38	1.9	0.25	2.0
Thre	0.33	0.94	0.24	1.7
Äpf	22	13	24	13
Fum	5.2	2.9	5.0	3.1
Bern	0.64	0.82	0.20	0.58
Zit	4.1	6.6	4.0	5.5
Glyzs	0.24	0.09	0.13	0.17
α-KGS	0.20	0.16	0.20	0.16
PGS	0.20	0.20	0.20	0.40
Nucl.	1.3	1.7	0.50	1.5
Sonst.	-	-	0.60	1.6

Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. Ipm	Lösl. %	Unlös. %
1a	5	1 252 376	98	2.0
1b	30	1 762 680	94	6.0
1c	5/+	1 459 030	99	1.0
1d	30/+	2 562 620	97	3.0
2a	10	627 821	99.58	
			F _n /%	F _s /%
			0.29	0.13

Tabelle 53. Wie Tab.6.

Saccharomyces
carlsbergensis.

Tabelle 54. Wie Tab.7.

Saccharomyces
carlsbergensis.

* = S.d.Abb.30.

Austausch an der Carboxylgruppe des Pyruvats in die C₃-Verbindungen. Das Auftreten markierten Citrullins, Arginins und radioaktiver Nucleotide beweist, daß zumindest über das Carbamylphosphat C¹⁴O₂ fixiert wurde.

Bei *S.cerevisiae* und *S.carlsbergensis* wurde die C¹⁴O₂-Fixierung bereits von Stoppani et al., 1958, (115) eingehender untersucht. Sie stellten u.a. fest, daß gewaschene Zellen von *S.carlsbergensis*

unter Stickstoff doppelt so viel $C^{14}O_2$ fixierten, wenn der Versuchsansatz Glucose enthielt. In Gegenwart von Sauerstoff lagen die Gesamtfixierungen niedriger, doch erhöhte sich bei Glucosefütterung die $C^{14}O_2$ -Aufnahme im Vergleich zur Leerprobe um mehr als das Vierfache. Unter anaeroben Bedingungen führte die Verteilung des C^{14} nach einer Fixierungszeit von 20 Minuten zu einer mit 31 % bzw. 32 % fast gleich-starken Markierung der Äpfel- und Asparaginsäure. Im Unterschied zu den hier vorliegenden, unter aeroben Bedingungen durchgeführten Versuchen gelangte wenig Aktivität in die Glutaminsäure, relativ viel dagegen in die Bernsteinsäure, da die oxydativen Schritte des Zitronensäurezyklus gehemmt, die unter Reduktion verlaufenden Reaktionen begünstigt werden.

III. Pilze.

Fusarium discolor.
Rhizopus oryzae.
Absidia glauca.
Mucor mucedo.
Pyronema confluens.
Aspergillus flavus.
Oospora lactis.
Chaetomium spec.

Fusarium discolor.

Es wurden drei Versuchsserien zu je vier Proben angesetzt (Tab.55, 2,3,4). Die Zellen fixierten in Abhängigkeit von der Zeit zunehmend C^{14} in die Produkte der löslichen und unlöslichen Fraktionen. Die Glucosefütterung (2c,2d) führte nicht zu einer sichtbaren Erhöhung der Fixierungsraten. Der Anteil der flüchtigen Produkte an der Gesamtfixierung betrug 0.80 % (1a).

Um die gut übereinstimmenden Ergebnisse zweier verschiedener Versuchsserien (3,4) zu veranschaulichen, wurden von beiden Diagramme angefertigt (14,15).

Nach kurzer Zeit enthielt die Äpfelsäure in den Proben 3a und 4a über 50 % der Gesamtaktivität. Die Asparaginsäure als unmittelbares Folgeprodukt der Oxaleessigsäure fällt dagegen nicht wie das Malat im weiteren Verlauf der Fixierungszeit ab, sondern zeigt sogar einen prozentualen Anstieg. In beiden Fällen gingen jedoch die Prozentsätze der Zitronensäure zurück. In die Glutaminsäure gelangt zunehmend Aktivität.

Die Ergebnisse ähneln denen, die bei *Rhodotorula glutinis* gefunden wurden. Offensichtlich katalysiert auch bei dem hier vorliegenden Organismus das Malic-Enzym die wichtigste Carboxylierungsreaktion, ohne daß die direkte Bildung der Oxaleessigsäure ausgeschlossen werden kann.

In beiden Versuchsserien wurde außerdem über das Carbamylphosphat und die Aminoimidazolribonucleotid-Carboxylase $C^{14}O_2$ eingebaut. Der Anteil der Pyrimidin- und Purinnucleotide betrug nach 10 Minuten in Probe 3d 5.5 % und nach 9 Minuten in Probe 4 c über 15 %.

Aus den Tabellen 57 und 58 können ferner die Daten über die Verteilung des C^{14} in weitere Sekundärprodukte entnommen werden. Von

Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. Ipm	Lösl.	Unlös	F _n /%	F _s /%
1a	10	6 016 276	99.2		0.62	0.16
2a	5	2 253 496	92	8.0		
2b	30	5 426 496	71	29		
2c	5/+	2 045 358	93	7.0		
2d	30/+	3 877 440	70	30		
3a	0.50	438 240	100	-		
3b	1	880 194	99	1.0		
3c	3	1 339 056	98	2.0		
3d	10	3 004 160	95	5.0		
4a	0.25	65 268	100	-		
4b	0.50	338 118	99	1.0		
4c	9	1 946 840	85	15		
4d	40	1 690 700	60	40		

Tabelle 55. Wie Tab.6.
Fusarium
discolor.

Vers.Nr.	4c *	4d
Verbin- dungen	Hydrolyse	
%	9'	40'
Asp	54	46
Glu	9.7	10
Thre	7.0	9.3
Ala	1.9	2.8
Meth	22	15
Val	1.3	1.4
Leu/Ileu	3.6	0.2
Pro	-	2.5
Cyst	0.50	1.0

Tabelle 56.

Wie Tab.10.

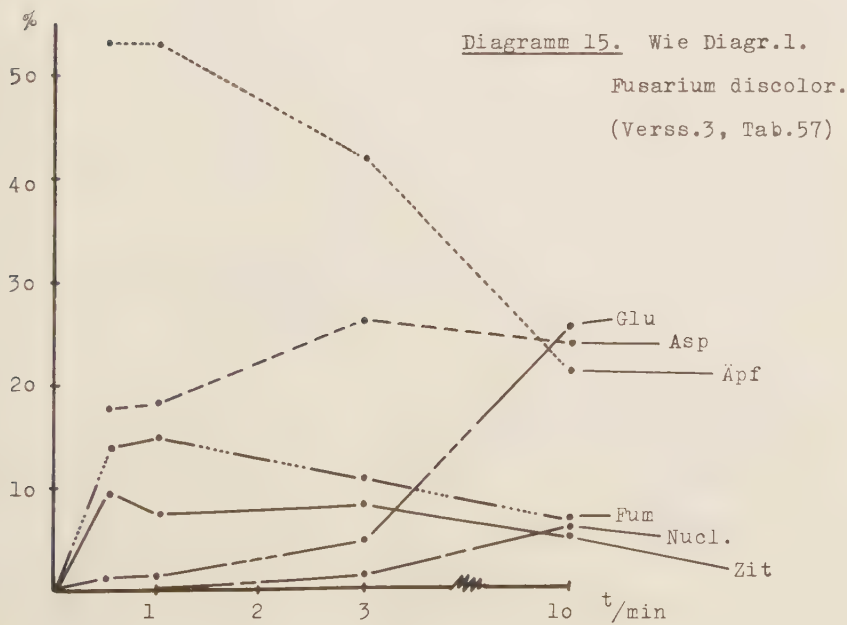
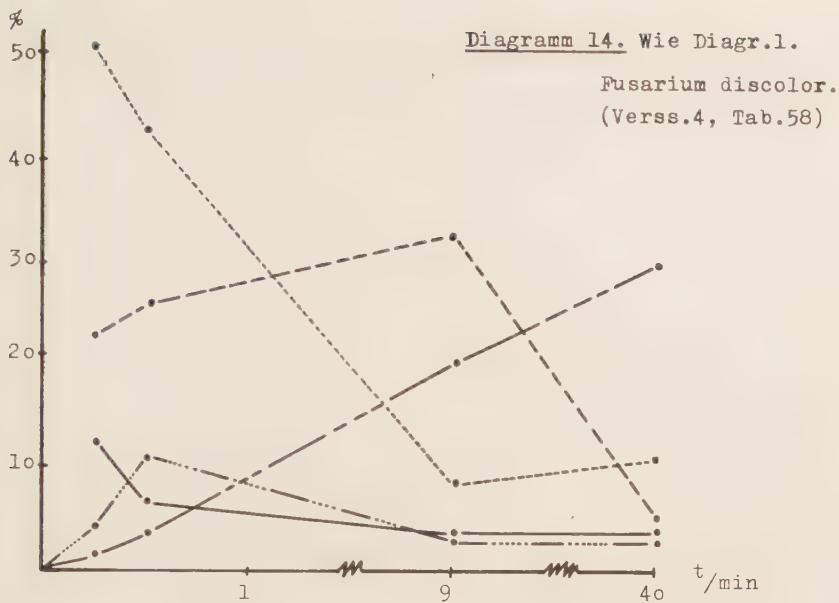
Fusarium
discolor.

Proteinhydro-
lysate.

* = S.d.a.Abb.35.

den C₃-Verbindungen werden die Phosphoglyzerin- und -brenztraubensäure, die Glyzerin- und brenztraubensäure, das Alanin, Serin und Glykokoll markiert. Dies ist verständlich, da nach Austausch des C¹⁴ über die Pumarsäure Aktivität in die Brenztraubensäure gelangt, wenn die Äpfelsäure über die reversible Malic-Enzym-Reaktion gespalten wird. Sicherlich findet auch ein unmittelbarer Austausch mit C¹⁴O₂ an der Carboxylgruppe des Pyruvats statt.

In der Versuchsserie 2 zeigte die Aufarbeitung der Proben 2a und 2b, daß nach 5 bzw. 30 Minuten die prozentuale Verteilung der Gesamtkaktivität in etwa derjenigen der anderen beiden Versuchsserien entspricht, wenn man die zeitlichen Verschiebungen berücksichtigt. Die Glucose=



Vers.Nr.	2a	2b	2c	2d	* 3a	3b	3c	3d
Verbindungen	Inkubationszeit / min							
	5	30	5, +	30 +	0.30	1	3	10
Asp	29	26	26	29	18	18	26	24
Alu	18	27	33	22	1.4	1.4	4.9	23
Glutn	1.8	3.9	1.6	3.7	-	-	-	2.7
Gly ^o	1.6	1.1	0.93	1.3	-	0.23	0.83	0.34
Ala	1.4	1.1	1.9	0.57	-	0.26	1.0	4.2
Thre	2.7	3.8	2.0	3.6	-	-	-	0.96
Cit	1.6	1.1	1.0	0.76	-	0.26	1.0	0.96
Arg	0.58	0.92	0.77	0.95	-	-	0.36	1.0
Apf	21	0.3	9.0	0.4	53	53	42	21
Fum	4.8	1.5	1.7	1.4	14	15	11	6.8
Bern	1.4	0.88	0.30	0.20	3.2	2.9	2.6	4.1
Zit	2.7	2.4	5.3	2.8	16	7.5	8.5	5.1
α-KGS	0.16	0.54	0.93	0.55	-	0.11	0.11	0.12
FGS, FEB	0.41	-	-	-	-	0.25	0.16	-
NMF?	0.62	-	-	-	-	-	-	0.25
UMF	0.92	0.86	0.21	0.36	-	-	0.40	0.16
AMP ¹¹¹	1.3	1.1	2.8	0.70	-	-	-	1.7
1	1.3	2.4	2.2	2.5	-	0.43	0.32	0.37
2	3.9	6.6	5.9	8.1	-	-	0.34	1.6
3	3.2	11	2.9	11	-	-	0.27	1.4
Uridin	-	-	0.45	0.43	-	-	-	-
Adenosin	-	-	0.74	0.24	-	-	-	-
Sonst.	1.6	1.5	1.2	3.2	-	-	-	1.2

Tabelle 57. Wie Tab.7. *Fusarium discolor*

o = Enthält Serin.

* = S.d.a.Abb.32.

Vers.Nr.	4a	4b	4c	4d*	(4d)*	Vers.Nr.	4a	4b	4c	4d*	(4d)*
Verbindungen %	Inkubationszeit/min					Verbindungen %	Inkubationszeit/min				
	0.25	0.50	9	40	40		0.25	0.50	9	40	40
Asp	23	26	33	6.7	7.3	UMP	-	-	1.5	0.55	0.60
Glu	1.7	3.7	19	25	28	IMP	-	-	-	0.30	0.15
Glutn	-	-	1.4	3.2	0.88	AMP	-	-	4.0	3.3	2.2
Gly/Ser	1.2	1.7	0.61	0.50	0.50	1	-	1.5	1.7	3.5	4.4
Ala	-	-	1.2	1.2	1.3	2	-	0.20	2.4	3.8	
Thre	-	-	3.2	2.8	2.6	3	-	2.0	4.6	9.6	8.4
Meth	-	-	3.4	9.5	9.0	Uridin	-	-	1.2	1.4	4.8
Cit	1.8	4.2	0.51	0.15	0.12	Adenosin	-	-	0.36	3.3	6.6
Arg	-	-	0.39	0.56	0.50	Adenin	-	-	-	0.50	0.50
Pro	-	-	-	1.5	1.2	NAD	-	-	-	0.47	-
Val	-	-	-	0.80	0.80	Inosin	-	-	-	0.15	-
Lys	-	-	-	0.34	0.30	Sonst.	-	-	-	1.8	0.98
Äpf	51	43	8.3	10	9.9	Tabelle 58. Wie Tab.7. Fusarium discolor. * = Mit Polydase S behandelte Probe o = Vgl.d.a.Abb.33. • = " " 34.					
Fum	4.7	11	2.7	2.9	2.7						
Bern	3.0	0.69	0.66	1.5	1.7						
Zit	13	6.9	3.1	4.1	3.9						
BTS	-	-	-	-	0.24						
Glyzs	-	-	-	0.30	0.30						
PGS/PEB	-	-	-	0.36	-						

fütterung bewirkte vor allem eine Erhöhung des prozentualen Anteils der Pyrimidin- und Purinnucleotide. Für den höheren Umsatz dieser Produkte spricht die Tatsache, daß in den löslichen Fraktionen markiertes Uridin und Adenosin auftraten.

In Versuchsserie 4 wurde das eingeeingte Eluat der löslichen Fraktion von Probe 4 geteilt. Die eine Hälfte wurde vor dem Chromatographieren mit Polydase S behandelt (s.Meth.S.27 ff), während die andere unbehandelt blieb. Die Phosphatspaltung mit Polydase wurde vorgenommen,

um zu prüfen, ob nach länger Fixierungszeit die Zuckerphosphate radioaktiv markiert werden. Diese Verbindungen lassen sich nur schwer von den gleichfalls markierten Nucleotiden trennen. Ein Vergleich der Ergebnisse zeigt (Tab.58, 4d,(4d), vgl.d.a.Abb.33,34), daß die Prozentsätze der Nucleotide zugunsten des Urins und Adenosins abnahmen und die Phosphoenolbrenztraubensäure in Brenztraubensäure umgewandelt wurde. Freie, markierte Zucker wurden nicht gefunden.

Bei den Proben 4c und 4d der Versuchsserie 4 (Tab.55) wurden die im Rückstand enthaltenen Nucleinsäuren enzymatisch in die löslichen Bestandteile übergeführt und abgetrennt. Die Chromatographie ergab, daß neben den Pyrimidin- auch die Purinbasen vorhanden waren.

Die Hydrolyse des Proteins (Tab.56) zeigte, daß nach einer Fixierungszeit von 9 Minuten (4c) über 50 % der Gesamtaktivität dieser Fraktion in der Asparaginsäure enthalten waren. Die anderen Prozente verteilten sich auf die Glutaminsäure, das Threonin, Methionin, Prolin, Cystein und Isoleucin, sowie auf die von C_3 -Verbindungen sich ableitenden Aminosäuren Alanin, Valin und Leucin.

Rhizopus oryzae.

Der Organismus fixierte in Abhängigkeit von der Zeit zunehmend C^{14} in die löslichen Zellbestandteile (Tab.59). In Versuchsserie 2 wirkte sich die Glucosefütterung (2c,2d) aus den bekannten Gründen nachteilig auf die Höhe der Fixierungsraten aus. Die Aufarbeitung der flüchtigen Fraktionen (1a) zeigte nur einen unerheblichen Prozentsatz an markiertem Material.

Zwar nahm unter den markierten Produkten der löslichen Fraktionen (Diagramm 16) der prozentuale Anteil der Äpfelsäure als einziger ab, doch deutet auch hier der prozentual hohe Anteil der Asparaginsäure trotz des Fehlens eines Abfalls nach kurzen Zeiten darauf hin, daß neben der sicherlich bevorzugten Bildung der C_4 -Körper über die Malic-Enzym-Reaktion die Carboxylierung der C_3 -Verbindungen zu Oxal-essigsäure möglicherweise eine Rolle spielt.

Ein Vergleich der Proben 3a und 3b in Tabelle 62 zeigt, daß über den Strom des Zitronensäurezyklus die Markierung aus den Dicarbonsäuren verschwindet und in jene Sekundärprodukte gelangt, deren Bildung vom "Syntheseteil" des Zitronensäurezyklus ihren Ausgang nimmt.

Die typischen Fixierungsprodukte der Carbamylphosphat- und Aminoimidazolribonucleotid-Carboxylase-Reaktion treten erst nach längerer Zeit auf. Die aus den Chromatogrammen eluierten und untersuchten

Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. ipm	Lösl. %	Unlös. %	F _n /%	F _s /%
1a	1o	5 542 5o4	99.74		o.o9	o.17
1b	1o	2 o87 162	98	2.o	Tabelle 59. Wie Tab.6. Rhizopus oryzae.	
1c	4o	3 238 444	94	6.o		
2a	5	941 28o	-	-		
2b	3o	1 615 o4o	-	-		
2c	5/+	453 76o	-	-		
2d	3o/+	947 7oo	-	-		
3a	o.25	1o1 65o	-	-		
3b	o.5o	143 o44	-	-		
3c	1	294 192	-	-		
3d	1o	3 o75 88o	99	1.o		

Tabelle 6o. Wie Tab.1o.

Rhizopus oryzae.

Hydrolysate der Rückstände.

Nucleotide	1	2	* 3
UTP	99	-	-
ATP	1.o	-	-
UDP _g	-	99	-
UDP	-	-	92
ADP	-	-	2.4
GDP	-	-	2.1
IDP	-	-	o.18
OMP?	-	-	1.5
Sonst.	-	1.o	1.3

Tabelle 6o.

Vers.Nr.	1b	1c
Verbindungen	Zeit/min	
	%	1o 4o
Asp	71	5o
Glu	17	28
Thre	1.3	3.6
Cyst	-	4.o
Uracil	11	13
Guanin	-	1.6

Tabelle 61. Wie Tab.52

Rhizopus oryzae.

* = S.d.a.Abb.36.

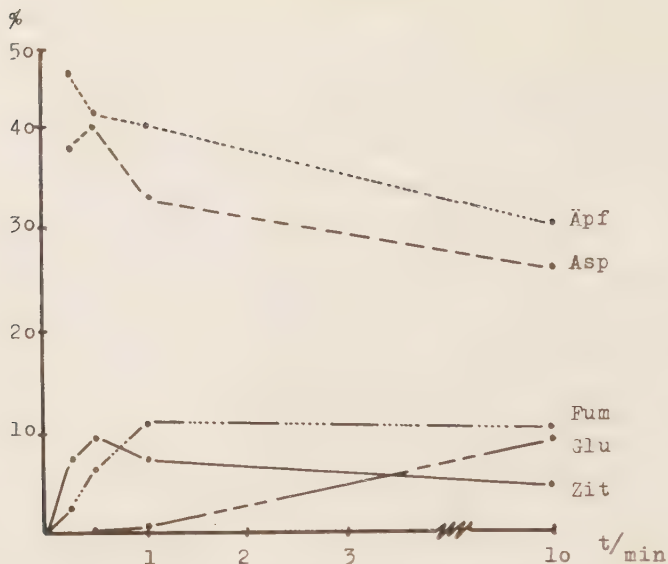


Diagramm 16. Wie Diagr.1. *Rhizopus oryzae*.
(Versuchsserie 3, Tab.62).

Mischflecke 1,2 und 3 enthielten überwiegend markierte Pyrimidinabkömmlinge (Tab.61, s.d.Abb.36), während die Purinverbindungen sehr wenig Aktivität aufwiesen.

Die Hydrolyse der Rückstände der Proben 1b und 1c (Tab.60) ergab einen hohen Prozentsatz an markierter Asparaginsäure, ferner in der Reihenfolge ihres prozentualen Anteils Glutaminsäure, Threonin und Cystein. Das Uracil war nach 10 Minuten mit 11 %, nach 40 Minuten mit 13 % an der Gesamtaktivität des Unlöslichen beteiligt. Die Verteilung des C^{14} in den Fraktionen der löslichen Produkte wurde bei dieser Versuchsserie nicht bestimmt.

Absidia glauca.

Bei diesem Organismus gelangte ebenfalls nur wenig C^{14} in die leichtflüchtigen Produkte (Tab.63, 1a). Das Gemisch der flüchtigen Säuren (F_s) wurde chromatographiert. Das Autoradiogramm (Abb.31) zeigt neben zwei unbekannten Produkten und etwas Essigsäure fast ausschließlich markierte Ameisensäure, die vermutlich aus Spaltungsreaktionen des Stoffwechsels stammt.

Vers.Nr.	2a	2b	2c	2d	3a	3b	3c	3d
Verbindungen %	Inkubationszeit / min							
	5	30	5/+	30/+	0.25	0.50	1	10
Asp	28	20	25	18	38	40	33	25
Aspn	1.1	1.3	0.75	1.3	-	-	-	0.65
Glu	7.4	8.1	5.0	6.2	-	-	0.51	8.4
Glutn	1.8	2.7	0.75	1.3	-	-	-	0.65
Gly	-	-	-	-	-	-	-	0.65
Ala	0.34	0.51	0.41	0.49	-	-	-	1.1
Thre	0.33	0.64	0.54	0.81	-	-	-	1.1
Meth	-	-	-	-	-	-	1.6	1.0
Cit	2.2	2.3	0.93	0.98	-	-	0.11	1.4
Arg	2.1	2.3	2.6	3.4	-	-	-	0.93
Äpf	27	24	39	29	45	41	40	30
Fum	5.3	3.3	8.4	7.2	2.7	6.4	11	10
Bern	1.5	2.3	1.1	2.6	6.0	2.6	0.68	2.3
Zit	7.7	8.1	7.4	7.8	7.1	9.4	7.2	4.9
Glyzs	0.86	0.59	0.32	0.45	1.6	0.88	1.4	0.67
PGS	0.19	-	-	-	-	-	3.2	0.08
1	2.2	2.0	0.94	1.4	-	-	-	0.78
2	2.5	2.9	1.7	3.4	-	-	-	0.72
3	7.4	15	4.1	11	-	-	0.28	4.8
UMP	1.5	0.77	0.83	0.82	-	-	0.28	0.70
AMr'''	0.22	0.95	-	0.29	-	-	-	0.67
Uridin	0.32	0.94	0.26	0.69	-	-	-	0.68
Adenosin Inosin	0.89	1.7	0.41	0.67	-	-	-	0.20
Sonst.	3.5	1.6	0.66	2.2	-	-	0.70	2.6

Tabelle 62. Wie Tabelle 7. *Rhizopus*
oryzae.

Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. Ipm	Lösl. %	Unlös. %	F _n /%	F _s /%
1a	10/+	14 437 486	99.40		0.03	0.57
1b	10/+	4 496 386	95	5.0		
1c	40/+	4 421 580	92	8.0		
2a	5	100 000	-	-		
2b	30	180 000	-	-		
2c	5/+	175 920	-	-		
2d	30/+	384 400	-	-		
3a	0.25	31 296	-	-		
3b	0.50	37 758	-	-		
4a	0.50	41 408	-	-		
4b	1	141 150	-	-		
4c	1/+	106 200	-	-		
4d	3	221 731	-	-		
4e	10	312 480				

Vers.Nr.	1b	1c
Verbin- dungen	Hydrolyse	
%	10/+	40/+
Asp	33	26
Glu	8.0	18
Meth	20	29
Cyst	-	1.0
Uracil	39	23
Adenin	-	1.0
Guanin	-	1.3

Tabelle 63. Wie Tab.6.

Absidia glauca.

Tabelle 64. Wie Tab.10.

Absidia glauca.

Hydrolysate des Unlös-
lichen.

Die Gesamtfixierungen der Versuchsserien 2,3 und 4 zeigen in Abhängigkeit von der Fixierungszeit eine Zunahme. Die im Unlöslichen festgelegte Radioaktivität wurde außer bei den Proben 1b und 1c nicht gemessen. Die Glucosefütterung bewirkte nur in den Proben 2c und 2d eine Erhöhung der Fixierungsrate.

Wie aus dem Diagramm 17 und aus Tabelle 65 zu ersehen ist, wurde in der löslichen Fraktion der Probe 4a (30 sec) über 50 % der Gesamaktivität in der Äpfelsäure gefunden. Die Asparaginsäure zeigt nach kurzen Zeiten in den Proben 3a, 3b, 4a-4d den schon bekannten Anstieg im prozentualen Anteil.

Die bei *Absidia glauca* gefundenen Ergebnisse erlauben die gleiche

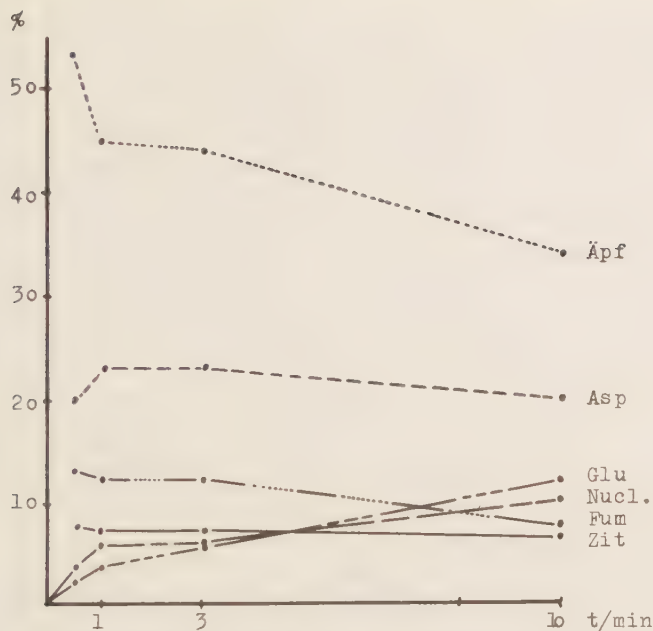


Diagramm 17. Wie Diagr.1. *Absidia glauca*.
(Versuchsserie 4, Tab.65).

Interpretation wie bei *Rhodotorula glutinis* (S.101), *Fusarium discolor* (S.111) und *Rhizopus oryzae* (S.116), daß nämlich vorwiegend über die Malic-Enzym-Reaktion $C^{14}O_2$ fixiert wird.

Die einzelnen Versuchsserien vermitteln auch bei *Absidia glauca* ein einheitliches Bild der $C^{14}O_2$ -Fixierung. Neben der C_3+C_1 -Addition wird $C^{14}O_2$ in das Citrullin, in die Pyrimidin- und Purinnucleotide fixiert.

Die Hydrolyse des Rückstandes der Probe 1b und 1c (Tab.64) ergab markierte Asparagin- und Glutaminsäure, radioaktives Methionin und Cystein. Uracil enthielt 39 % bzw. 23 % der in diesen Fraktionen enthaltenen Gesamtaktivität. Unzerstörtes Adenin und Guanin wurde nur in Probe 1c (40 min) gefunden.

Vers.Nr.	2a	2b	2c	2d	3a	3b	4a	4b	4d	* 4e	4c
Verbindungen %	Inkubationszeit / min										
	5	30	5/+	30/+	0.25	0.50	0.50	1	3	10	1/+
Asp	28	17	15	11	28	38	20	23	23	19	22
Aspn	1.1	3.1	1.3	3.1	-	-	-	-	-	0.57	-
Glu	13	21	14	13	2.4	1.7	2.7	3.9	5.3	11	3.1
Glutn	0.53	1.2	1.5	3.3	-	-	-	-	-	0.92	-
Gly	-	3.6	0.36	1.9	-	0.50	-	-	-	1.2	-
Ala	1.3	1.5	1.2	1.4	-	0.50	-	0.70	-	1.1	-
Thre	-	1.0	0.40	0.73	-	0.97	-	-	-	0.75	-
Cit	2.3	1.2	1.9	2.4	5.1	4.6	-	-	0.53	0.50	-
Arg	0.52	2.9	0.84	2.6	-	-	-	-	-	0.31	-
Äpf	26	17	33	28	38	32	53	45	44	34	49
Fum	7.8	4.2	9.0	3.7	8.4	5.8	13	12	12	7.7	12
Bern	1.9	1.3	1.1	1.0	1.2	1.7	-	0.86	1.6	1.3	0.30
Zit	7.3	6.3	11	10	9.1	6.2	7.4	7.1	7.0	6.6	6.0
α-KGS	0.98	1.1	0.56	0.73	-	-	-	-	0.65	0.73	-
PGS	-	-	-	0.78	-	-	-	1.1	-	0.78	-
1	1.6	4.4	2.0	2.9	-	3.8	-	1.0	1.8	3.9	2.5
2	4.5	6.4	5.1	4.4	1.3	1.4	-	2.8	2.6	4.4	1.3
3	-	2.6	-	2.6	2.1	1.3	-	-	0.30	2.6	-
UMP	1.3	1.7	1.1	0.36	4.2	0.50	4.0	2.0	1.3	0.36	4.0
AMP	-	-	-	1.8	-	-	-	-	-	1.8	-
NMP?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.52	-
Uridin	-	-	-	-	-	0.50	-	-	-	-	-
Sonst.	1.2	2.5	0.60	4.3	-	0.72	-	-	-	-	-

Tabelle 65. Wie Tab.7. Absidia glauca.

*= Vgl.d.a.Abb.37.

Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. lpm	Lösl. %	Unlös. %	F _n /%	F _s /%
1a	10	2 535 640	99.30		0.42	0.28
1b	0.25	20 664	-	-		
1c	0.50	108 188	-	-		
1d	10	1 234 548	62	38		
2a	5	779 600	-	-		
2b	30	1 540 320	-	-		
2c	5/+	977 000	-	-		
2d	30/+	1 112 080	-	-		
3a	40/+	743 908	90	10		

Tabelle 66. Wie Tab.6.

Mucor mucedo.

Mucor mucedo.

Die Tabelle 66 zeigt, daß in Abhängigkeit von der Versuchszeit zunehmend $C^{14}O_2$ fixiert wurde. In die flüchtigen Produkte der Probe 1a gelangte nur wenig C^{14} . Die Glucosefütterung führte erst nach längerer Fixierungszeit (2c (30 min)) zu einer Senkung der Gesamtfixierung.

Bemerkenswert ist der hohe Anteil der Asparaginsäure, obwohl nur die Äpfelsäure den für ein primäres Fixierungsprodukt typischen Abfall im prozentualen Anteil an der Gesamtfixierung zeigt. In Versuchsserie 1 sind nach 25 (1b) und 30 (1c) Sekunden nur vier Produkte markiert, nämlich die Äpfel- und Fumarsäure, die Asparagin- und Zitronensäure. Der Anteil der Asparaginsäure steigt von 52 % auf 70 % an. Die Verteilung des C^{14} in die Sekundärprodukte stimmt in den Versuchsserien 1 (1d) und 2 recht gut überein, wenn man die Werte der Fixierungszeit entsprechend einordnet.

Die Hydrolyse der Rückstände der Proben 1d und 3d (Tab.67) ergab, daß die Asparaginsäure 70 % der Gesamtaktivität enthielt. Außer der Glutaminsäure wurde noch das Methionin und das Threonin markiert. Radioaktives Uracil ließ sich nur in Spuren nachweisen, was bei Probe 2d auf Grund des prozentual geringen Anteils der Nucleotide im Löslichen zu erwarten war.

Bei *Mucor mucedo* erfolgt die $C^{14}O_2$ -Fixierung mit großer Wahrscheinlichkeit über die Malic-Enzym-Reaktion, vermutlich aber auch über

Vers.Nr.	1b	1c	1d	2a	2b	2c	2d*	2d	3a ^x
Verbindungen %	Inkubationszeit / min							Hy	Hy
	0.25	0.50	10	5	30	5/+	30/+	10	40/+
Asp	52	70	43	54	41	52	43	72	71
Aspn	-	-	0.45	0.56	0.44	0.94	0.63	-	-
Glu	-	-	8.9	8.9	10	8.0	9.9	21	10
Glutn	-	-	0.59	0.88	1.5	3.3	1.3	-	-
Gly	-	-	0.94	1.6	1.2	0.68	0.42	-	-
Ala	-	-	0.86	1.2	1.3	0.61	1.5	-	-
Thre	-	-	0.85	0.64	0.54	0.76	1.4	2.0	14
Cit	-	-	1.0	1.2	0.54	0.74	0.40	5.0	5.0
Meth	-	-	0.27	-	-	-	-	-	-
Pro	-	-	0.30	0.35	0.52	0.36	0.38	-	-
Äpf	33	21	21	13	9.8	13	11	-	-
Fum	5.7	2.9	4.6	5.1	2.2	2.9	1.0	-	-
Bern	-	-	0.90	2.7	0.82	0.47	0.34	-	-
Zit	9.1	6.3	6.9	1.0	3.0	3.2	3.0	-	-
Glyzs	-	-	1.8	0.38	0.38	0.25	0.57	-	-
PGS	-	-	1.1	0.70	0.60	-	0.70	-	-
α-KGS	-	-	-	0.20	0.47	0.20	0.49	-	-
1	-	-	1.7	0.37	2.7	1.8	2.8	-	-
2	-	-	1.1	1.1	2.2	2.1	1.8	-	-
3	-	-	-	5.4	17	6.7	15	-	-
UMP	-	-	-	-	0.43	0.42	0.45	-	-
AMP	-	-	-	0.75	0.48	0.74	0.63	-	-
Uracil	-	-	-	-	-	-	-	Spur	
Sonst.	-	-	3.7	-	2.9	1.0	3.0	-	-

Tabelle 67. Wie Tab.7. *Mucor mucedo*.

• = Enthält Serin. * = Vgl.d.Abb.38.

Hy = Wie Tab.10. Hydrolysate des Unlöslichen.

x = C¹⁴-Verteilung im "Lösl." nicht bestimmt.

jene Carboxylierungsmechanismen der C_3+O_1 -Addition, durch die unmittelbar Oxalessigsäure gebildet wird. Nach relativ langen Fixierungszeiten wird $C^{14}O_2$ auch über das Carbamylphosphat und durch die Aminoimidazolribonucleotid-Carboxylase eingebaut.

Pyronema confluens.

Die Gesamtfixierungen zeigen, daß in allen Versuchsserien in Abhängigkeit von der Zeit zunehmend C^{14} in die Produkte der löslichen Fraktionen eingebaut wurde (Tab.68). Die Glucosefütterung förderte den Einbau des $C^{14}O_2$ besonders in den Proben mit kurzer Fixierungszeit (2c, 3c). In den leichtflüchtigen Fraktionen F_n und F_s der Probe 1a war nur wenig Aktivität enthalten. Die Chromatographie ergab, daß wie bei *Absidia glauca* fast ausschließlich die Ameisensäure markiert war (s.d.a.Abb.31).

Das zur Versuchsserie 3 gehörende Diagramm 18 zeigt einen hohen prozentualen Anteil der Äpfelsäure. Im Verlauf der Fixierungszeit gehen bei ihr wie auch bei der Asparaginsäure die Prozentsätze zugunsten der Glutaminsäure zurück. Die Summe des prozentualen Anteils der Pyrimidin- und Purinnucleotide beträgt nach 1 Minute nur 6.3 %, nach 10 Minuten dagegen 35 %.

Wie auch den Werten der Tabelle 72 zu entnehmen ist, erfolgte die Fixierung des $C^{14}O_2$ vorwiegend über die Malic-Enzym-Reaktion. Der starke Strom markierter Substanz über die Malic-Dehydrogenase-Reaktion in die Oxalessigsäure hat zur Folge, daß innerhalb 1 Minute der prozentuale Anteil der Äpfelsäure von 40 % (3a) auf 28 % (3b) abfällt, während der Anteil der Asparaginsäure im gleichen Zeitraum nur um 1 % zurückgeht. Die Zitronensäure nimmt sogar von 15 % auf 19 % zu. In einer zweiten Versuchsserie (4) liegt dagegen das Maximum nach 30 Sekunden (4b) nicht beim Citrat, sondern beim Aspartat. Trotz der relativ stark markierten Fumarsäure zeigt sich eine nur schwache Zunahme der Aktivität in der Bernsteinsäure.

In Tabelle 69 wurden die Ergebnisse zusammengestellt, die von Parallelproben mit Glucosefütterung erhalten wurden. Der erhöhte Stoffumsatz führte zu geringfügigen Verschiebungen im prozentualen Anteil der Sekundärprodukte und Nucleotide.

Die Hydrolyse der Rückstände (Tab.70) von Proben der Versuchsserie 1 zeigte die bereits hinlänglich bekannte Verteilung des C^{14} in die "primären" und "sekundären" Aminosäuren. Die Nucleinsäuren enthielten nur wenig Radioaktivität, denn der prozentuale Anteil des Uracils betrug

Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. lpm	Lösl. %	Unlös. %	F _n /%	F _s /%
1a	10	7 613 732	97	72	0.88	1.4
1b	10	2 751 644	97	3.0	-	-
1c	40	3 528 454	91	9.0	-	-
2a	5	214 560	Vers.Nr.			
2b	30	1 132 740	Verbinderungen %			
2c	5/+	502 410	Inkubzeit/min			
2d	30/+	1 167 170	1/+ 5/+ 30/+			
3a	0.50	95 040	Asp	19	12	7.7
3b	1	134 670	Glu	13	21	20
3c	1/+	211 410	Glutn	-	2.6	6.6
3d	3	851 264	Gly	2.2	3.0	3.4
3e	10	988 288	Ala	0.50	4.1	2.5
4a	0.25	19 646	Thre	-	1.2	0.64
4b	0.50	114 492	Cit	6.3	4.2	2.4
4c	2	519 840	Arg	-	3.1	3.5
			Äpf	27	14	9.8
			Fum	6.0	4.1	2.7
			Bern	0.92	1.5	0.45
			Zit	16	12	11
			α-KGS	0.84	0.64	1.7
			βGS	1.1	-	-
			1	2.5	2.7	1.5
			2	1.9	3.8	3.5
			3	0.92	7.4	17
			UMP	0.88	1.6	1.4
			IMP/AMP	1.8	1.3	2.0
			Inosin	-	0.37	1.0
			Adenosin	-	-	0.50
			Sonst.	-	-	0.80

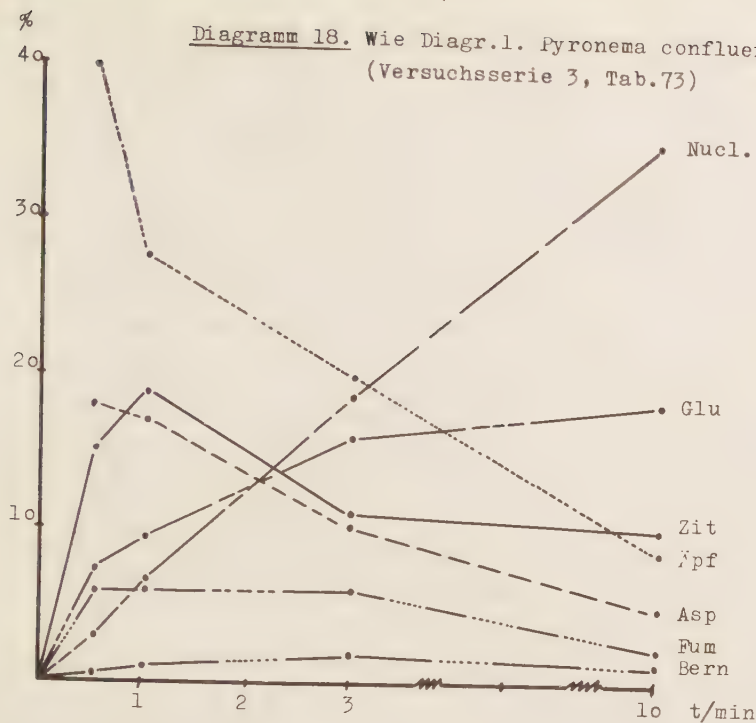
Tabelle 68. Wie Tab.6.

Pyronema confluens.

Tabelle 69. Wie Tab.7.

Pyronema confluens.

Diagramm 18. Wie Diagr.1. *Pyronema confluens*.
(Versuchsserie 3, Tab.73)



Vers.Nr.	1b	1c
Verbindungen %	Ink'z./min	
	10	40
Asp	47	42
Glu	13	15
Gly	13	14
Ala	1.0	4.8
Thre	3.4	1.4
Meth	11	11
Cyst	2.5	0.82
Leu	-	0.70
Pro	-	2.5
Uracil	9.1	1.9

Nucleotide	3	3c/G
UTP / UDP	-	57
UDP	99	-
ATP / ADP	Spur	6.8
GDP / IDP	Spur	-
THDPG?	-	36

Tabelle 71. Wie Tab.52.

Pyronema confluens.

G = Mischfleck 1,2,3.

Tabelle 70. Wie Tab.10.

Pyronema confluens.

Hydrolysate des Un-
löslichen.

Vers.Nr.	2a	2b	3a	3b	*3d	3e	4a	4b	4c
Verbindungen %	Inkubationszeit / min								
	5	30	0.50	1	3	10	0.25	0.50	2
Asp	15	7.4	18	17	10	4.7	9.8	13	5.7
Glu	21	18	7.2	9.2	15	21	-	2.8	6.4
Glutn	4.6	8.3	-	-	1.4	7.2	-	-	-
Gly	1.2	3.7	-	-	2.3	1.5	-	-	0.54
Ala	3.0	2.6	-	0.85	1.5	0.84	-	-	4.8
Thre	1.4	0.66	-	-	0.15	-	-	-	-
Meth	-	-	-	1.1	0.91	0.75	-	-	-
Cit	2.5	2.3	11	6.5	7.7	5.5	-	-	0.45
Arg	3.6	2.5	-	-	-	0.89	-	-	-
Äpf	13	11	40	28	20	8.4	63	50	41
Fum	3.7	2.7	5.7	5.7	5.7	2.1	8.7	13	11
Bern	1.2	0.53	0.19	1.1	1.9	0.62	-	3.5	5.7
Zit	12	11	15	19	11	9.6	19	17	19
α-KGS	1.1	1.2	-	1.6	-	-	-	-	-
PGS	-	-	1.6	1.4	1.1	-	-	-	-
1	1.7	0.96	-	0.90	3.9	2.8	-	0.47	0.82
2	3.2	3.6	-	0.90	5.3	6.3	-	-	-
3	7.5	17	-	0.63	5.1	10	-	-	0.73
UMP	1.3	1.5	1.5	3.5	1.1	1.0	-	-	-
IMP/AMP	1.3	1.3	-	1.3	2.0	3.4	-	-	-
Inosin	0.80	0.41	-	-	1.2	0.75	-	-	-
NMP?	-	-	-	-	0.78	0.71	-	-	-
Adenosin	-	0.71	-	-	1.5	10	-	-	-
Sonst.	1.0	2.6	-	2.3	0.50	2.0	-	-	2.6

Tabelle 72. Wie Tabelle 7. *Pyronema confluens*.

* = S.d.a. Abb. 39.

Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. Ipm	Lösl. %	Unlös. %	F _n /%	F _s /%
1a	10	5 421 866	99.34		0.25	0.41
2a	5	339 690	-	-		
2b	30	420 000	-	-		
2c	5/+	439 590	-	-		
2d	30/+	398 010	-	-		
3a	0.50	167 256	-	-		
3b	1	370 430	-	-		
3d	3	853 200	99	1.0		
3e	10	1 941 370	97	3.0		
3f	40	2 572 440	89	11		
3c	1/+	329 400	-	-		

Tabelle 73. Wie Tab.6.

Aspergillus flavus.

nach 10 Minuten (1b) keine 10 % und nach 40 Minuten (1c) nur mehr 1.9%. Die Verteilung des C¹⁴ in den löslichen Fraktionen wurde bei diesen Proben nicht untersucht.

Bei den löslichen Fraktionen der Versuchsserie 3 (Tab.72) wurden die Nucleotide genauer bestimmt. Der Mischfleck 3 wurde aus den Chromatogrammen der verschiedenen Proben eluiert und die in ihm enthaltenen Produkte enzymatisch in die Nucleoside umgewandelt. Es zeigte sich, daß die markierten Nucleosiddiphosphate fast ausschließlich aus UDP bestanden (Tab.71), während die entsprechenden Purinnucleotide nur in Spuren vorhanden waren. Von Probe 3c wurden die von allen drei Mischflecken (1,2,3) gesammelten Nucleotide untersucht. Das ATP, ADP enthielt insgesamt 6.8 %, das UTP, UDP 57 % der in diesem Gemisch gemessenen Impulse. Ferner wurde wie schon bei *Candida spec.* eine Phosphatverbindung des Thymidins gefunden, deren Anteil 36 % betrug.

Aspergillus flavus.

Die markierten Produkte der leichtflüchtigen Fraktionen des Versuchsansatzes 1a (Tab.73) waren nur mit 0.66 % an der Gesamtaktivität beteiligt. Die Glucosefütterung bewirkte in den Proben 2d und 3c im Vergleich zu den Leerproben 2b und 3b keine Erhöhung der Fixierungsraten.

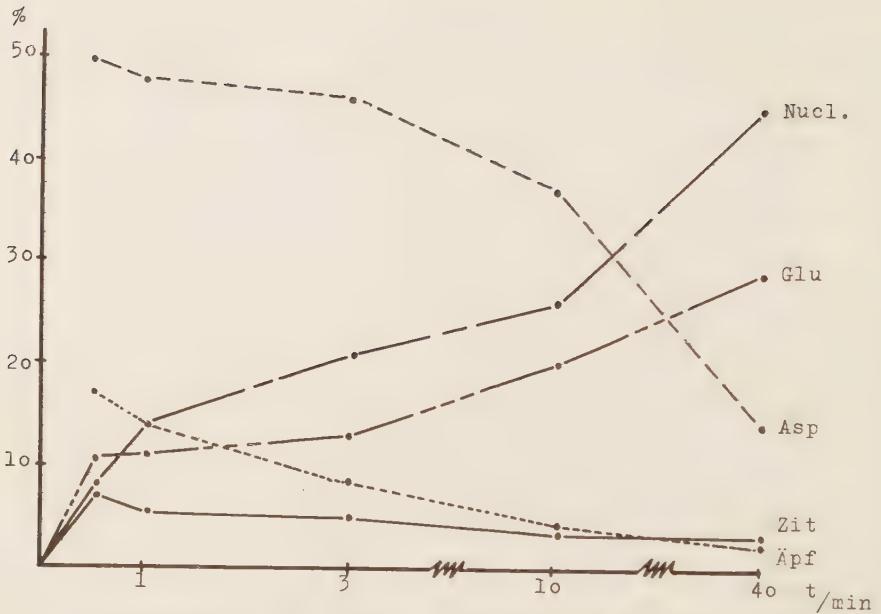


Diagramm 19. Wie Diagrl.1. *Aspergillus flavus*.
(Versuchsserie 3, Tab.76).

Vers.Nr.	3d	3e	3f
Verbindungen %	Inkub'zeit/min		
	3	10	40
Asp	65	51	45
Glu	-	9.0	15
Gly	-	-	4.0
Ala	-	-	5.0
Meth	-	12	12
Cyst	-	-	1.5
Uracil	35	28	15
Guanin	-	-	1.8

Tabelle 74. Wie Tab.10.

Aspergillus flavus.

Hydrolysate des Un-
löslichen.

Nucleotide	1/2	3
UTP / CTP	90	-
UDPG	-	-
ATP	7.5	-
GTP	2.5	-
UDP	-	90
GDP	-	7.0
OMP?	-	3.0

Tabelle 75. Wie Tab.52.

Aspergillus flavus.

Vers.Nr.	2a	2b	2c	2d	3a *	3b	3d	3e	3f	3c
Verbin- dungen %	Inkubationszeit / min									
	5	30	5/+	30/+	0.50	1	3	10	40	1/+
Asp	16	12	22	11	50	48	46	37	14	31
Glu	24	13	19	12	11	11	11	19	28	8.9
Glutn	2.9	1.9	1.4	2.4	-	0.31	1.5	1.3	0.68	-
Gly	3.5	4.4	1.9	2.8	0.29	0.50	1.0	1.4	1.3	1.4
Ala	4.6	5.9	2.6	2.6	-	0.51	0.30	0.48	0.41	-
Thre	0.63	1.1	1.0	1.3	-	-	0.64	0.90	1.4	-
Cit	0.63	1.0	1.2	1.2	0.81	1.7	1.4	0.93	0.24	1.2
Arg	1.0	0.41	0.85	1.2	-	-	-	0.54	-	-
Meth	-	-	-	-	-	-	-	0.87	1.5	-
Äpf	20	17	25	32	17	14	8.5	4.3	2.1	24
Fum	3.7	5.0	4.6	7.4	1.5	1.7	1.4	0.82	0.57	5.2
Bern	5.3	23	2.9	13	-	0.35	0.12	-	-	-
Zit	6.2	3.2	6.0	3.6	7.9	5.6	5.1	3.7	3.2	9.7
PGS/PEB	-	1.0	-	-	-	-	1.4	0.79	0.86	-
1	1.0	0.38	0.79	0.33	2.1	2.8	2.2	1.8	16	2.1
2	3.0	1.4	2.0	3.0	-	2.1	2.6	5.4		3.3
3	5.9	4.1	6.2	4.9	3.6	4.2	10	16		3.0
UMP	1.1	0.54	0.71	0.18	2.0	2.8	2.8	0.99	1.9	3.8
AMP	-	1.0	1.8	1.2	-	0.31	1.4	1.5	1.6	1.8
IMP	-	-	-	-	-	-	0.34	-	0.67	1.0
Uridin	0.50	1.9	-	-	0.98	1.5	1.5	0.62	2.4	1.8
Sonst.	-	1.8	-	-	2.8	2.7	0.90	1.7	-	1.8

Tabelle 76. Wie Tab.7. *Aspergillus flavus*.

• = Enthält Serin (< 20%)

* = Vgl.d.a.Abb.40.

In Abhängigkeit von der Fixierungszeit wurde zunehmend C^{14} in die Zellsubstanzen der löslichen und soweit bestimmt auch der unlöslichen Fraktionen eingebaut.

Das Diagramm 19 zeigt Asparagin-, Zitronen- und Äpfelsäure als primäre Fixierungsprodukte der C_3+C_1 -Addition. Das Hauptgewicht der $C^{14}O_2$ -Fixierung liegt hier weniger auf der Reaktion des Malic-Enzyms als vielmehr auf den Carboxylierungsreaktionen, die primär Oxalessigsäure bilden.

Dieses Ergebnis ist besonders im Zusammenhang mit den Untersuchungen von Woronick et al., 1961, (116) interessant. Bei *Aspergillus niger* wurden nämlich zwei Enzymsysteme gefunden, die $C^{14}O_2$ in die Oxalessigsäure fixierten. Die Verfasser konnten hingegen keine durch das Malic-Enzym katalysierte Reaktion nachweisen. Sie zitieren jedoch die positiven Befunde von Ramakrishnan (117) und räumen ein, daß dessen Versuchsanordnungen, die allein auf den Test dieser Fixierungsreaktion abgestellt waren, geeigneter sind.

Der Anstieg des prozentualen Anteils der Glutaminsäure (Tab.76) läßt auf den Umsatz markierter Substanzen über den Zitronensäurezyklus schließen.

Über das Carbamylphosphat und durch die Aminoimidazolribonucleotid-Carboxylase wird zunehmend $C^{14}O_2$ fixiert, denn die Summe des Anteils der Pyrimidin- und Purinnucleotide beträgt nach 40 Minuten (3f) über 40 %.

Die Auftrennung der Mischflecke 1 (Nucleosidtriphosphate) und 2 (UDPG) ergab (Tab.75), daß sich deren Gesamtaktivität zu 90 % auf das UTP und UDPG, zu nur 10 % auf das ATP und GTP verteilte. Bei den Nucleosiddiphosphaten (Mischfleck 3) war das Verhältnis zwischen Pyrimidin- und Purinbasen ähnlich.

Die Rückstände von drei Proben der Versuchsserie 3 (3d,3e,3f) wurden hydrolysiert. Nach einer Fixierungszeit von 3 Minuten (3d) waren nur die Asparaginsäure mit 65 % und das Uracil mit 35 % markiert (Tab. 74). Im weiteren Verlauf der Fixierung zeigt sich deutlich, wie im Falle der Aminosäuren das C^{14} über Sekundärprodukte in das Protein gelangte, indem nämlich u.a. Glutaminsäure und Methionin auftraten.

Oospora lactis.

Es liegen nur Ergebnisse vor, die nach relativ langen Fixierungszeiten erhalten wurden (Tab.77). Die Glucosefütterung erhöhte die Gesamtfixierung beträchtlich. Die Aufarbeitung der löslichen Fraktionen

Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. Ipm	Lösl. %	Unlös. %
1a	10	998 208	96	4.0
1b	60	2 046 080	98	2.0
1c	10/+	3 027 068	98	2.0

Tabelle 77. Wie Tab.6.

Oospora lactis.

Nr.	Zeit min	Gesamtfixg. Ipm
1a	5	532 580
1b	30	1 347 850
1c	5/+	624 900
1d	30/+	1 178 640

Tabelle 78. Wie Tab.6.

Chaetomium spec.

(Tab.79) ergab, daß die Äpfelsäure einen hohen Prozentsatz der Gesamtaktivität enthielt. Nach 60 Minuten (1b) betrug der Anteil markierter Bernsteinsäure 65 %. Die Fixierung des $C^{14}O_2$ dürfte vermutlich über das Malic-Enzym erfolgen. Über den Zitronensäurezyklus gelangte das C^{14} in die Asparagin-, Zitronen- und Glutaminsäure. Ferner wurden die Phosphoglyzerinsäure, das Glykokoll, Serin, Alanin und Threonin markiert. Über das Carbamylphosphat und durch die Aminoimidazolribonucleotid-Carboxylase wurde auch bei diesem Organismus $C^{14}O_2$ eingebaut.

Chaetomium spec.

Die Glucosefütterung führte im Verlauf von 30 Minuten (Tab.78, 1d) zu einer Verdünnung des $C^{14}O_2$ durch $C^{12}O_2$. Von den löslichen Produkten (Tab.80) war hauptsächlich die Asparaginsäure markiert. Offensichtlich wird das $C^{14}O_2$ unmittelbar in Oxallessigsäure fixiert. Da auch die vergleichsweise niedrigen Prozentsätze der Äpfelsäure im Laufe der Fixierungszeit abnehmen, kann die Teilnahme des Malic-Enzyms bei der C_4 -Körper-Synthese nicht ausgeschlossen werden. Das C^{14} gelangte über den Zitronensäurezyklus in die hinlänglich bekannten Sekundärprodukte.

Relativ hoch ist der Anteil der Nucleotide. Das C^{14} wurde überwiegend in den Pyrimidinphosphaten gefunden.

Vers.Nr.	1a	1b	1c	1d
Verbindungen %	Inkubationszeit/min			
	5	30	5/+	30/+
Asp	46	16	43	15
Aspn	0.79	-	0.74	0.32
Glu	16	27	23	33
Glutn	1.2	6.4	2.0	6.4
Gly	-	1.2	0.24	1.7
Thre	1.6	4.8	1.8	4.6
Meth	1.2	3.0	1.2	3.0
Cit	3.5	1.3	1.9	0.78
Arg	0.92	0.29	0.63	0.95
Ala	0.61	1.2	0.94	0.63
Äpf	5.2	1.5	5.3	2.3
Fum	1.3	0.36	1.3	0.60
Bern	-	0.26	-	0.63
Zit	2.1	2.1	2.3	2.0
α-KGS	0.26	0.15	0.31	0.25
PGS/PEB	0.41	-	0.58	-
1	3.4	2.4	2.5	0.76
2	6.0	12	4.8	12
3	4.5	17	2.5	11
UMP	1.8	1.3	1.3	1.1
AMP !!!	0.79	0.74	0.76	0.89
Sonst.	2.5	1.0	2.9	2.1

Tabelle 80. Wie Tab.7.

Chaetomium spec.

Vers.Nr.	1a	1b	1c
Verbindungen %	Inkub't'sz./min		
	10	60	10/+
Asp	3.0	5.0	13
Glu	3.0	8.1	3.0
Glutn	-	0.25	-
Gly/Ser	0.50	0.26	0.24
Ala	2.2	5.0	0.58
Thre	-	0.18	-
Cit	-	0.26	-
Arg	-	0.14	-
Äpf	38	9.5	43
Fum	16	4.5	11
Bern	37	65	26
Zit	0.51	0.45	0.82
PGS	-	0.33	0.68
α-KGS	0.18	-	-
1	-	0.13	-
2	-	0.24	-
3	-	0.07	0.43
UMP	-	-	0.21
AMP !!!	-	0.20	0.39

Tabelle 79. Wie Tab.7.

Oospora lactis.

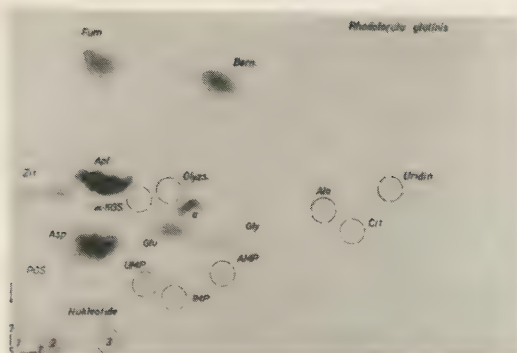


Abbildung 26. Wie Abb.5.

Rhodotorula glutinis.

Fixierungszeit: 1 min.

Gasphase: Luft.

Substrat: -

(Tab.46, Probe 2a).

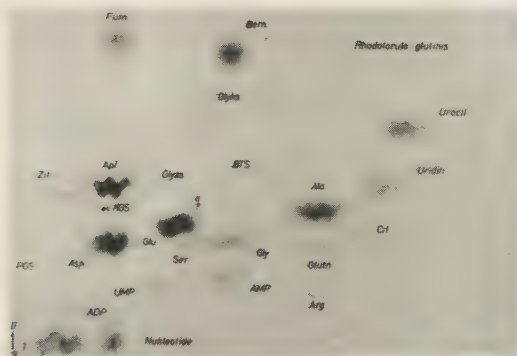


Abbildung 27. Wie Abb.5.

Rhodotorula glutinis.

Fixierungszeit: 10 min.

Gasphase: Luft.

Substrat: -

Laufmittel:

I. Phenol-Wasser-EDTA -
Eisessig.

II. Butanol-Propionsäure-
Wasser.

(Tab.46, Probe 2d, vgl.d.
Abb.28).



Abbildung 28. Wie Abb.5.

$C^{14}O_2$ -Fixierung durch

Rhodotorula glutinis.

Chromatographische Trennung der Aminosäuren, Nukleotide und Basen im zweidimensionalen System: S.a.S.34.

II. Butanol-Propionsäure-
Wasser.

III. Butanol-Pyridin-Wasser.

(Tab.46, Probe 2d, vgl.d.
Abb. 27).

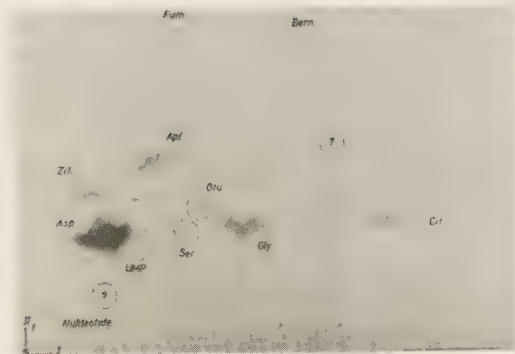


Abbildung 29. Wie Abb.5.

Candida crusei.

Fixierungszeit: 2 min.

Gasphase: Luft.

Substrat: -

(Tab.50, Probe 2c).

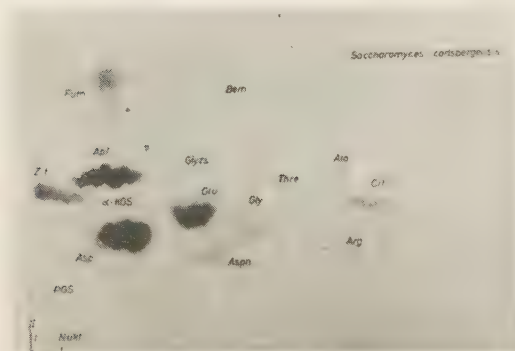


Abbildung 30. Wie Abb.5.

Saccharomyces
carlsbergensis.

Fixierungszeit: 5 min.

Gasphase: Luft.

Substrat: Glucose (0.1% E).

(Tab.54, Probe 1c).

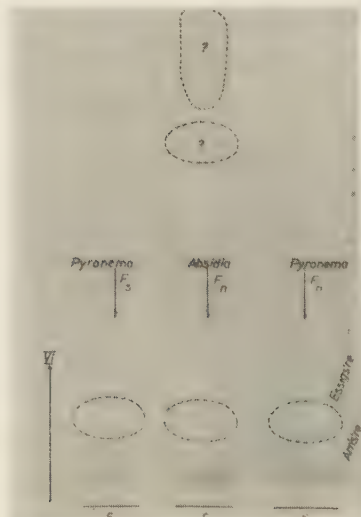


Abbildung 31.

$C^{14}O_2$ -Fixierung durch

Absidia glauca.

Pyronema confluens.

Chromatographische Trennung
leichtflüchtiger Säuren im
eindimensionalen System:

Butanol-Ammoniak-Wasser.
(S.d.S.30).

F_s = Fraktion der leichtflüch-
tigen Säuren.

F_n = Fraktion der leichtflüch-
tigen Alkohole nach vor-
heriger Oxydation.

Absidia glauca: Tab.63, 1a.

P. confluens : Tab.68, 1a.

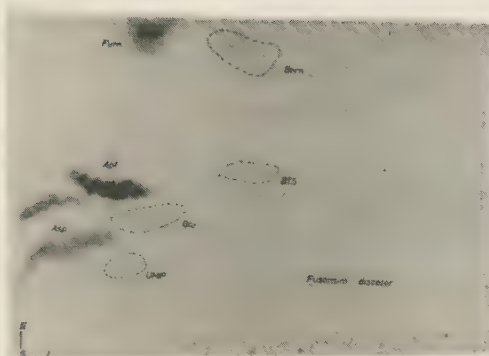


Abbildung 32. Wie Abb.5.

Fusarium discolor.

Fixierungszeit: 30 sec.

Gasphase: Luft.

Substrat: -

(Tab. 57, Probe 3a)

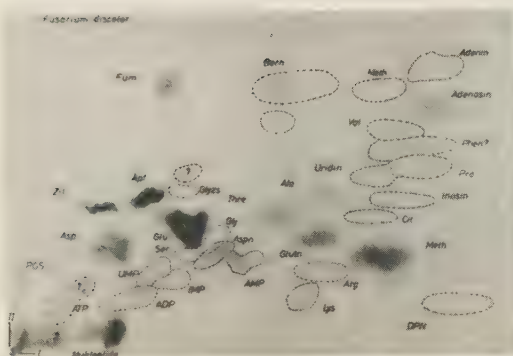


Abbildung 33. Wie Abb.5.

Fusarium discolor.

Fixierungszeit: 40 min.

Gasphase: Luft.

Substrat: -

(Tab.58, Probe 4d).

(Vgl.d.3.Abb.34).

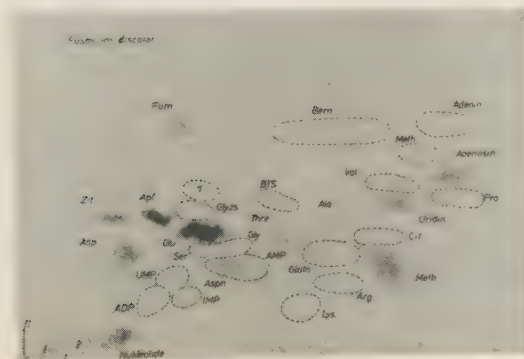


Abbildung 34. Wie Abb.33.

Fusarium discolor.

Chromatographische Trennung der mit "Polydase" behandelten Fraktion der Probe (4d) (Tab.58).

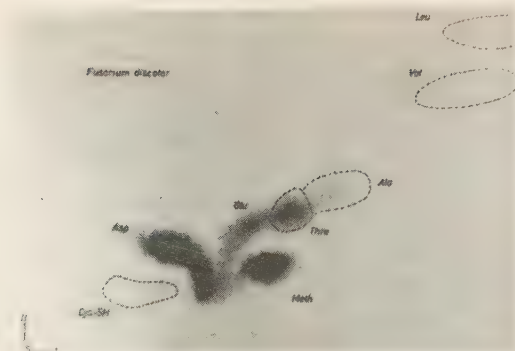


Abbildung 35. Wie Abb.11.
Fusarium discolor.
(Tab.56, Probe 4c).

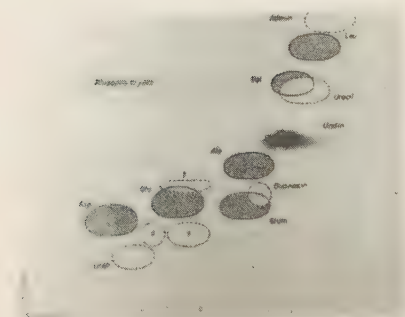


Abbildung 36. Wie Abb.10.
Rhizopus oryzae.
(Tab.61 ,Mischfleck 3).

Anm.:

Anhand der auf Chromatogrammen dieser Art vorliegenden markierten Nukleosiden und Basen wurden in den Tabellen die den Mischflecken entsprechenden Phosphatverbindungen eingetragen.

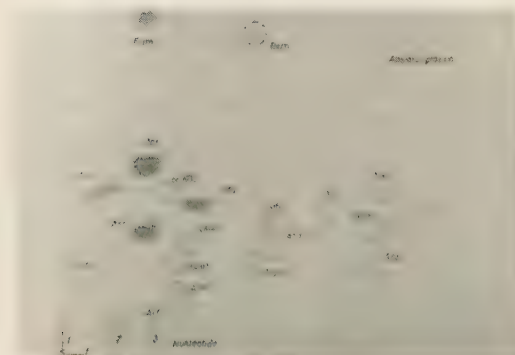


Abbildung 37. Wie Abb.5.

Absidia glauca.

Fixierungszeit: 10 min.
Gasphase: Luft.
Substrat: -

(Tab.65, Probe 4e).

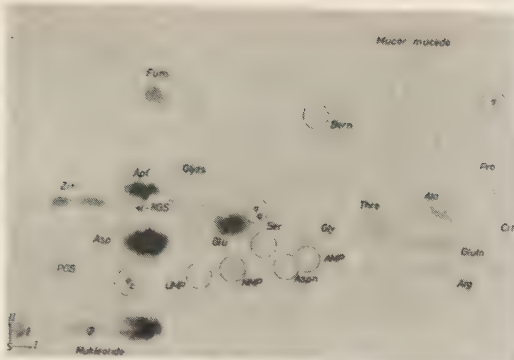


Abbildung 38. Wie Abb.5.

Mucor mucedo.

Fixierungszeit: 30 min.

Gasphase: Luft.

Substrat: Glucose (0.1% E).

(Tab.67, Probe 2d).

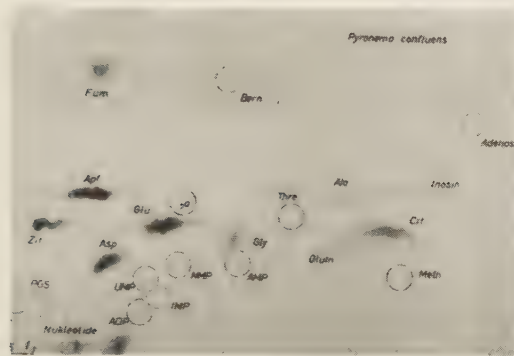


Abbildung 39. Wie Abb.5.

Pyronema confluens.

Fixierungszeit: 3 min.

Gasphase: Luft.

Substrat: -

(Tab.72, Probe 3d).

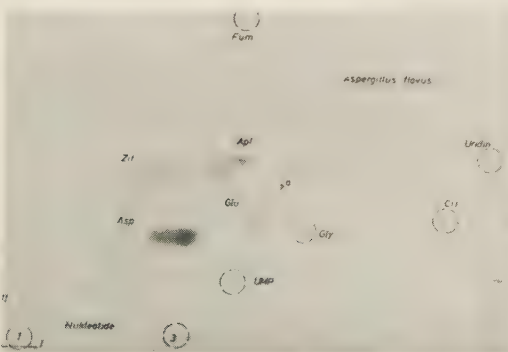


Abbildung 40. Wie Abb.5.

Aspergillus flavus.

Fixierungszeit: 30 sec.

Gasphase: Luft.

Substrat: -

(Tab.76, Probe 3a).

D. Schlußbetrachtung.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchungen wurden bereits bei der Darstellung ausführlich diskutiert.

Die Kinetik (15 sec. - 40 min) der prozentualen Verteilung markierter Produkte ermöglichte es, primäre und sekundäre Fixierungsprodukte zu unterscheiden. Zwischen den Parallelproben mit Zellmaterial verschiedener Anzuchten ergaben sich erwartungsgemäß mehr oder minder große quantitative Unterschiede in der C^{14} -Verteilung. Die charakteristische Zeitabhängigkeit des prozentualen Anteils blieb jedoch qualitativ gleich.

Die Tabelle 81 gibt eine Übersicht, welche der bekannten Carboxylierungsreaktionen auf Grund der hier erhobenen Befunde als wirksam angenommen werden müssen. In der Gruppe der "Wood-Werkman-Reaktion", die hier als Sammelbegriff aller über α -K²B oder Pyruvat verlaufenden Fixierungsmechanismen gebraucht wird, soll die Zahl der Kreuze angeben, ob vorwiegend Oxallessigsäure oder Äpfelsäure als Primärprodukte auftreten.

Alle Organismen fixieren $C^{14}O_2$ über die "Wood-Werkman-Reaktion". Ein nennenswerter $C^{14}O_2$ -Einbau findet zudem über das Carbamylphosphat und durch die Aminoimidazolribonucleotid-Carboxylase statt. Die untersuchten Organismen synthetisieren fast ausnahmslos Citrullin, sowie die Pyrimidin- und Purinnucleotide. Ob das Fehlen von Citrullin bei *Pseudomonas pyocyanea* und der Purin- und Pyrimidin-nucleotide bei *Staphylococcus aureus* auf wirklichem Unvermögen zur Synthese beruht oder ob diese Verbindungen nur unter den hier vorliegenden Versuchsbedingungen (Stickstoffmangel) nicht gebildet wurden, kann nicht entschieden werden.

Bei *Mycobacterium phlei* und *Nocardia rubra* macht die rasche und starke Markierung der Bernsteinsäure einen weiteren Mechanismus der C_3+C_1 -Addition wahrscheinlich. Vermutlich ist hier die Propionyl-Carboxylase wirksam.

Bei den meisten Organismen treten markierte C_3 -Verbindungen auf. Möglicherweise erfolgt neben der Umkehrung der C_3+C_1 -Addition (Spaltung der in der α - und β -Carboxylgruppe markierten Oxallessigsäure) auch ein unmittelbarer Austausch des $C^{14}O_2$ mit der Carboxylgruppe der Brenztraubensäure.

Die zwei letzten Spalten der Tabelle 81 sollen anzeigen, bei welchen Organismen die Verteilung des C^{14} über den Zitronensäurezyklus

Mechanismen und Primärprodukte der $C^{14}O_2$ -Fixierung								Verteilung des C^{14} durch	
Organismus	Wood-W.-R.		P-C	PAR	Carbamylph.		AIRN		
	OES	Äpf	Bern	(BTS)	Cit	Pyr.N.	Pu.N.	TOC	Gl.BP.
Lactobazillen	++	-	-	-	+	+	+	-	-
Staph.aureus	++	-	-	-	+	-	-	(+)	-
Ps.pyocyanea	++	-	-	+	-	+	(+)	+	+
Sarcina flava	++	-	-	+	+	+	+	+	+
M.lysodeikt.	++	-	-	+	+	+	(+)	+	+
Flavobact.sp.	++	-	-	+	+	+	+	+	+
Propionibact. freudenreich.	++	-	-	+	+	+	+	+	-
Mycobact.phl.	++	+	+	+	+	+	+	+	-
Nocardia rub.	++	+	+	+	+	+	+	+	-
Esch.coli	++	+	-	+	+	+	+	+	-
Arthrobacter suboxydans	++	+	-	+	+	+	+	+	-
Aspergillus f.	++	+	-	+	+	+	+	+	-
Chaetomium sp.	++	+	-	+	+	+	+	+	-
Candida crus.	++	(+)	-	+	+	+	+	+	-
Corynebact. nephridii	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Nocardia fl.	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Bacillus coag	+	+	-	-	+	+	(+)	+	-
Strept.gris.	+	+	-	+	+	+	(+)	+	-
Sacch.carlsb.	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Rhodotorula glutinis	+	++	-	+	+	+	+	+	-
Candida spec.	+	++	-	+	+	+	(+)	+	-
Rhizopus ory.	+	++	-	+	+	+	+	+	-
Absidia glau.	+	++	-	+	+	+	+	+	-
Mucor mucedo	+	++	-	+	+	+	+	+	-
Pyronema cfl.	+	++	-	+	+	+	+	+	-
Oospora lact.	+	++	-	+	+	+	+	+	-
Fusarium dis.	+	++	-	+	+	+	+	+	-
Aerobacter a.	-	++	-	+	+	+	+	+	-
Serratia mar.	-	++	-	+	+	+	+	+	-

Tabelle 81. P-C = Propionyl-Carboxylase. TOC = Tricarbonsäurezyklus.
 AIRN = Aminoimidazolribonucleotid-Carboxylase.
 PAR = $C^{14}O_2$ -Austauschreaktion an der Carboxylgruppe der
 Brenztraubensäure.

Wood-W.-Reaktion = Wood-Werkman-Reaktion. Pu.N. = Purinnucleotide.
 Pyr.N. = Pyrimidinnucleotide. Gl.BP. = Glyoxylsäure-Bypass.

Nr.	Organismen	0.25	0.50	1	3	10	30	40	1/+
1	Coryneb.nephrid.	2.0	7.2	20 [*]	28 [*]	26	-	30	24
2	Candida crusei	1.7	8.8	6.2	-	-	6.4	-	-
3	Pyronema confl.	/ [*]	13	24	29	41	30 [*]	-	-
4	Absidia glauca	-	4.0	5.8	6.5	14	19 [*]	-	7.8
5	Rhodotorula gl.	/ [*]	-	9.3	20	24	29	3	-
6	Mycobact.phlei	-	-	4.6	7.7	13	-	15	3.7
7	Nocardia rubra	-	-	2.1	6.3	7.7	-	13	4.2
8	Serratia marces.	-	/	1.3	10	-	8.7	-	5.7
9	Fusarium disc.	-	/	0.69	2.7	7.4	24	28 [*]	-
10	Rhizopus oryzae	/	/	0.67	-	11	-	-	-
11	Chaetomium spec.	-	-	-	21 ¹	-	35	-	-
12	Candida spec.	-	-	-	13	-	7.9	-	-
13	Sacch.carlsbg.	-	-	-	2.6 ¹	-	4.3	-	-
14	Strept.griseus	-	-	-	1.0	-	12	7.0 ⁺	-
15	Arthrob.suboxd.	-	-	-	-	40	-	30	-
16	Bac.coagulans	-	-	-	-	14	-	28 ^o	-
17	Sarcina flava	/	/	/	/	4.4	7.2	-	5.7
18	Oospora lactis	-	-	-	-	0.18	-	1.0 ^o	-
19	Microc.lysodkt.	/	/	/	/	/	11 [*]	12	-
20	Nocardia flava	-	34	35	65	80	-	80	28
21	Flavobact.spec.	-	22	28	21	18	41	-	31
22	Aspergillus fl.	-	9.5	15	22	27	-	43	18
23	Esch.coli/Luft	-	-	5.1 ⁺	-	14 ⁺	20 ⁺	-	-
24	Propionibact.fr.	-	-	-	45 ¹	-	52	-	-
25	Ps.pyocyanea	-	/	/	1.3	2.5	4.7	-	5.7
26	Aerobacter aer.	-	/	/	/	1.8	5.0	-	3.6
27	Esch.coli/N ₂	-	-	/	-	1.1 ⁺	7.8 ⁺	-	-
28	Mucor mucedo	/	/	-	-	-	2.4	-	-

Tabelle 84. Prozentualer Anteil der Pyrimidin- und Purinverbindungen, sowie des Citrullins in Abhängigkeit von der Fixierungszeit.

1-19 : Prozentualer Anteil dieser Produkte an der Gesamtaktivität der löslichen Fraktionen.

20-28 : Prozentualer Anteil dieser Produkte an der Gesamtfixierung (lösliche und unlösliche Fraktion).

Anm. : Die untersuchten Milchsäurebakterien wurden in dieser Tabelle nicht aufgeführt. (S.d.S.143).

X = Fixierungszeit: 2 min. / = Proben ohne Nucleotidanteil.

1 = " " 5 min. - = Kein Versuch.

+ = Glucosezusatz. o = Fixierungszeit: 60 min.

* = Werte verschied. Verss.

bzw. Glyoxylsäure-Shunt erfolgte. Ersteres trifft mit Ausnahme der Lactobazillen für alle zu, letzteres für Organismen wie: *Ps.pyocyanea*, *M.lysodeikticus*, *S.flava*, *F.spec.*, *Candida crusei*, *C.nephridii* und *N.flava*.

Geordnet nach den Fixierungszeiten zeigt Tabelle 82 in einer Übersicht, mit wieviel Prozent jene Produkte an der Gesamtaktivität beteiligt waren, die über das Carbamylphosphat und durch die Aminoimidazolribonucleotid-Carboxylase gebildet wurden. Bei einigen Organismen z.B. *Candida crusei* (Nr.2) betrug der prozentuale Anteil auch nach langer Zeit weniger als 10 %, dagegen bei *N.flava* (Nr.20) nach 10 Minuten bereits 85 %. Diese krassen Unterschiede sind verständlich, wenn man bedenkt, daß durch das ausklingende Wachstum und den zunehmenden Stickstoffmangel in den gewaschenen Zellen die Reaktionen der Nucleotidsynthese ungleich mehr benachteiligt sind als die der C_3+C_1 -Addition. Dies zeigte sich recht eindrucksvoll bei den Milchsäurebakterien. Bei den in Tabelle 82 nicht aufgeführten Vertretern dieser Organismengruppe konnte ein hoher Einbau von C^{14} in die Nucleinsäurefraktion während des Wachstums festgestellt werden. Die Versuche mit gewaschenen Zellen zeigten dagegen mit Ausnahme einer Probe von *Sc. lactis* keine $C^{14}O_2$ -Fixierung in die Nucleotide. Markiertes Citrullin wurde ebenfalls nur bei *Sc.lactis* gefunden und zwar in den Proben, die Glucose als Substrat enthielten.

Das Schema im Anhang zeigt die bei den hier vorliegenden Versuchen beobachtete Verteilung des C^{14} über die bekannten Reaktionen des Stoffwechsels.

E. Zusammenfassung.

1. Fünfunddreißig heterotrophe Organismen wurden auf ihre Fähigkeit, $C^{14}O_2$ zu fixieren, geprüft.

Die Zellen wurden geerntet, gewaschen, in Phosphatpuffer resuspendiert und über verschieden lange Zeiten (15 sec - 40 min) mit $C^{14}O_2$ inkubiert.

Die markierten Produkte wurden identifiziert und ihr prozentualer Anteil an der Gesamtfixierung bestimmt. Der Methodik liegt das von Calvin et al. (78) verwendete Verfahren zugrunde, aus der zeitlichen Verschiebung der Prozentsätze markierter Produkte den Weg des C^{14} im Stoffwechsel zu verfolgen.

2. Die Ergebnisse zeigen, daß bei allen Organismen die "Wood-Werkman-Reaktion" als Typ jener Carboxylierungsreaktionen wirksam ist, die über das Phosphoenolpyruvat und Brenztraubensäure verlaufen.

Die rasche und starke Markierung der Bernsteinsäure macht bei *Mycobacterium phlei* und *Nocardia rubra* einen weiteren Mechanismus der C_3+C_1 -Addition wahrscheinlich. Vermutlich ist hier die Propionyl-Carboxylase wirksam.

Bei fast allen Organismen findet ein allerdings sehr unterschiedlicher Einbau von $C^{14}O_2$ über das Carbamylphosphat in das Citrullin und die Pyrimidinnucleotide statt. Relativ wenig C^{14} gelangte in die Purinverbindungen.

Neben den Produkten der C_3+C_1 -Addition enthielten häufig auch C_3 -Verbindungen Aktivität. Wahrscheinlich findet neben der Spaltung der "doppeltmarkierten" Äpfel- bzw. Oxallessigsäure (C^{14} -Austausch über Fumarsäure) auch ein unmittelbarer Austausch des $C^{14}O_2$ mit der Carboxylgruppe der Brenztraubensäure statt.

3. Auf Grund der festgestellten primären Produkte der $C^{14}O_2$ -Fixierung über die "Wood-Werkman-Reaktion" lassen sich folgende Gruppen von Organismen zusammenstellen:

a. Organismen, die durch CO_2 -Fixierung ausschließlich oder überwiegend Oxallessigsäure synthetisieren:

Lactobacillaceae.	Nocardia rubra.	Arthrobacter suboxydans.
Staphylococcus aureus.	Candida crusei.	Aspergillus flavus.
Mycobacterium phlei.	Chaetomium spec.	Propionibacterium freudenreichii.

b. Organismen, die CO_2 primär sowohl in Oxalessigsäure als auch in Äpfelsäure in ähnlichen Größenordnungen einbauen:

<i>Streptomyces griseus.</i>	<i>Nocardia flava.</i>
<i>Bacillus coagulans.</i>	<i>Escherichia coli.</i>
<i>Corynebacterium nephridii.</i>	

c. Organismen, die CO_2 überwiegend in Äpfelsäure wahrscheinlich über das Malic-Enzym fixieren:

<i>Rhodotorula glutinis.</i>	<i>Mucor mucedo.</i>	<i>Aerobacter aerogenes.</i>
<i>Fusarium discolor.</i>	<i>Candida spec.</i>	<i>Serratia marcescenz.</i>
<i>Pyronema confluens.</i>	<i>Oospora lactis.</i>	<i>Rhizopus oryzae.</i>
<i>Absidia glauca.</i>		

4. Außer bei den Lactobacillaceae fand eine intensive Verteilung des C^{14} über den Zitronensäurezyklus oder über seine charakteristischen Teilreaktionen statt.

Bei den Milchsäurebakterien bewirkte das Fehlen des Zitronensäurezyklus, daß noch nach Tagen fast ausschließlich die Asparaginsäure markiert war.

5. Bei *Ps.pyocyanea*, *S.flava*, *M.lysodeikticus*, *F.spec.*, *C.nephridii*, *N.flava* und *Candida crusei* wurde schon nach kurzen Fixierungszeiten stark markiertes Glykokoll gefunden. Aus verschiedenen Gründen wird angenommen, daß es über den Glyoxylat-Bypass entsteht.

6. Die Hydrolyse der Zellrückstände ergab, daß neben der Asparagin- und Glutaminsäure vor allem die Aminosäuren markiert waren, deren Synthese sich von diesen ableitet.

Häufig enthielten auch die Nucleinsäuren C^{14} . Die Aktivität war überwiegend im Uracil festgelegt. Das Uracil wurde abgebaut. Es zeigte sich, daß die Radioaktivität zu 77 % über das Carbamylphosphat in das Molekül gelangt. 23 % stammen aus der Asparaginsäure und damit aus der C_3+C_1 -Addition.

7. Bei den meisten Organismen wurde auch die Aktivität in den flüchtigen Fraktionen bestimmt. Nennenswert war sie nur bei *Propionibacterium freudenreichii* (40 % (Propionsäure)), *Pseudomonas pyocyanea* und *Flavobacterium spec.* (10 - 20 %). Bei den übrigen untersuchten Bakterien lag der Anteil zwischen 1 % und 3 %, bei Hefen und Pilzen unter 1 %.

F. Literaturverzeichnis.

1. Virtanen, A.I. Soumalaisen Tiedeakatemia Toimituksia 29, 26 (1928).
Zitat aus "The Bacteria" (10).
2. Kluver, A.J. "The Chemical Activities of Micro-Organism. London Univ. Press, London 1931.
3. Foster, J.W. "Chemical Activities of Fungi." Academic Press Inc., Publishers New York, N.Y. 1949.
4. Lebedev, A.F. Izvest.Donskovo Gosudarstvenno Universiteta 3, 25 (1921). Eng.Übersetzg. Am.Rev.Soviet Med. 5, 15 (1947/48).
5. Rippel, A. und F.Heilmann. Arch.Mikrobiol. 1, 119-136 (1930).
6. Golding, N.S. The gas requirements of molds. III. The effect of various concentrations of carbon dioxide on the growth of *Penicillium roqueforti*. J.Dairy Sci. 23, 891-898 (1940).
7. Hes, J.W. Function of carbon dioxide in the metabolism of heterotrophic cells. Nature (London) 141, 647-657 (1938).
8. Wood, H.G. und C.H.Werkman. The utilization of CO₂ by the propionic acid bacteria in the dissimilation of glycerol. J. Bacteriol. 30, 332 (1935).
9. Calvin, M. und N.G.Pon. Carboxylations and decarboxylations. J.Cell.Comp.Physiol. 54, 51-75 (1959).
10. Wood, H.G. und R.L.Stjernholm. Assimilation of carbon dioxide. - "The Bacteria". I.C.Gunsalus und R.Y.Stanier. Academic Press, New York und London (1962). Volume III.
11. Ochoa, S., A.H.Mehler und A.Kornberg. Isolation and properties of an enzyme from pigeon liver catalyzing the reversible oxidative carboxylation of L-malic acid. J.Biol.Chem. 174, 979-1000 (1948).
12. Ochoa, S. Isocitric dehydrogenase and carbon dioxide fixation. J. Biol. Chem. 159, 243-244 (1945).
- Grafflin, A.L. und Ochoa, S. Partial purification of isocitric dehydrogenase and oxalosuccinic carboxylase. Biochim. et Biophys. Acta 4, 205-210 (1950).
13. Horecker, B.L. und P.Z.Smyrniotis. The fixation of carbon dioxide in 6-phosphogluconic acid. J.Biol.Chem. 196, 135-142 (1952).

14. Elbertzhagen, H. Technical Status Report No 4. Office of Aerospace Research, Contract No. AF 61 (025)- 244 (1960).
15. Axelrod, B., R.S. Bandurski, C.M. Greiner und R. Lang. The metabolism of hexose and pentose phosphates in higher plants. J. Biol. Chem. 202, 619-634 (1955).
16. Moses, V., O. Holm-Hansen, M. Calvin. Nonphotosynthetic fixation of carbon dioxide by three micro-organisms. J. Bacteriol. 77, 70 (1959).
17. Flavin, M., P.J. Ortiz und S. Ochoa. Metabolism of propionic acid in animal tissues. Nature, 176, 823-826 (1955).
18. Beck, W.S., Flavin, M. und S. Ochoa. Metabolism of propionic acid in animal tissues. J. Biol. Chem. 229, 997-1000 (1957).
19. Beck, W.S. und S. Ochoa. Metabolism of propionic acid in animal tissues. J. Biol. Chem. 232, 931-938 (1958).
20. Lengyel, P., R. Mazumder und S. Ochoa. Mammalian methylmalonyl isomerase and vitamin B₁₂ coenzymes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 46, 1312 (1960).
21. Gibson, J. und M. Knight. Carboxylation of propionyl-CoA by extracts of Rhodospirillum rubrum. Biochem. J. 78, 8P (1961).
22. Bachhawat, B.K., W.G. Robinson und M.J. Coon. Carbon dioxide fixation in heart extracts by β -Hydroxyisovaleryl-CoA. J. Am. Chem. Soc. 76, 3098-3099 (1954).
23. Del Campillo-Campbell, E.E. Dekker und M.J. Coon. Biochim. et Biophys. Acta 31, 290 (1959).
24. Lynen, F., H.J. Knappe, E. Lorch und G. Jüttig. Carboxylation of β -methylcrotonyl CoA. Abstr. 135th Natl. Meet. Am. Chem. Soc., p. 40C. (1959) (Angew. Chemie 71, 481 (1959)).
25. Rilling, H.C. und M.J. Coon. The enzymatic isomerization of β -methylvinylacetyl Coenzyme A and the specificity of a bacterial β -methylcrotonyl-CoA carboxylase. J. Biol. Chem. 235, 3087 (1960).
26. Stern, J.R., D.L. Friedman und G.K.K. Menon. Enzymic carboxylation of butyryl-CoA to 2-ethylmalonyl-CoA. Arch. Biochim. Biophys. Acta 92, 280-281 (1961).
27. Lane, M.D., D.R. Halenz, D.P. Kosow und C.S. Hegre. Further studies on mitochondrial propionyl-carboxylase. J. Biol. Chem. 235, 3082-3086 (1960).

28. Utter, M.F. und D.B. Keech. Formation of oxalacetate from pyruvate and CO_2 . J. Biol. Chem. 235, PC 17-18 (1960).
29. Seubert, W. und V. Remberger. Reinigung und Wirkungsweise der Pyruvatcarboxylase aus *Pseudomonas citronellolis*. Biochem. Ztsch. 334, 401-414 (1961).
30. Jones, M.E., L. Spector und F. Lipman. Carbamylphosphat, the carbamyl donor in enzymatic citrullin synthesis. J. Am. Chem. Soc. 77, 819-820 (1955).
31. Jones, M.E. und L. Spector. The pathway of carbonate in the biosynthesis of carbamyl-phosphate. J. Biol. Chem. 235, 2897 (1960).
32. Gorini, L. und W.K. Maas. The potential for the formation of a biosynthetic enzyme in *E. coli*. Biochim. et Biophys. Acta 25, 208-209 (1957).
33. Krebs, H.A. und Henseleit, K. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. Zeitschr. physiol. Chem. 210, 33-66 (1932).
34. Sheperdson, M. und A.B. Pardee. Production and crystallization of aspartate transcarbamylase. J. Biol. Chem. 235, 2333 (1960).
35. Liebermann, J. und A. Kornberg. Enzymatic synthesis and breakdown of a pyrimidin, orotic acid. J. Biol. Chem. 207, 911-924 (1954).
36. Bandurski, R.S. und C.M. Greiner. The enzymatic synthesis of oxalacetate from phosphoryl-enolpyruvate and carbon dioxide. J. Biol. Chem. 204, 781-786 (1953).
37. Suzuki, I. und C.H. Werkman. Chemoautotrophic carbon dioxide fixation by extracts of *Thiobacillus thiooxydans*. I. Formation of oxalacetic acid. Arch. Biochem. Biophys. 76, 103-111 (1958).
38. Utter, M.F. und K. Kurahashi. Purification of oxalacetic carboxylase from chicken liver. J. Biol. Chem. 207, 787-802 (1954).
39. Evans, E.A., B. Vennesland und L. Slotin. J. Biol. Chem. 147, 771 (1943).
40. Utter, M.F. Interrelationships of oxalacetic and L-malic acids in carbon dioxide fixation. J. Biol. Chem. 188, 847-863 (1951).
41. Utter, M.F., Kurahashi, K. und I.A. Rose. Some properties of oxalacetic carboxylase. J. Biol. Chem. 207, 803-819 (1954).

42. Kurahashi, K., R.J. Pennington und M.F. Utter. Nucleotide specificity of oxalacetic carboxylase. *J. Biol. Chem.* 226, 1059-1075 (1957).
43. Quayle, J.R. und D.B. Keech. Carbon assimilation by *Pseudomonas oxalaticus* (OX 1). 1. Formate and carbon dioxide utilization during growth on formate. *Biochem. J.* 72, 623-630 (1959).
44. Quayle, J.R. und D.B. Keech. Carbon assimilation by *Pseudomonas oxalaticus* (OX 1). 2. Formate and carbon dioxide utilization by cell-free extracts of the organism growth on formate. *Biochem. J.* 72, 631-640 (1959).
45. Lukens, L.N. und J.M. Buchanan. Biosynthesis of the purines. *J. Biol. Chem.* 234, 1799-1805 (1959).
46. Magasanik, B. Purine and pyrimidine nucleotides. - "The Bacteria". Vol. III. I.C. Gunsalus und R.Y. Stanier. Academic Press, New York und London (1962).
47. Siu, F.M.L., H.G. Wood, R.L. Stjernholm. Fixation of CO₂ by phosphoenolpyruvic carboxytransphosphorylase. *J. Biol. Chem.* 236, PC 21/22 (1961).
48. Swick, R.W. und H.G. Wood. The role of transcarboxylation in propionic acid fermentation. *Proc. Natl. Acad. U.S.* 46, 28-41 (1960).
49. Koepsell, H.J. und M.J. Johnson. Dissimilation of pyruvic acid by cell free preparation of *Clostridium butylicum*. *J. Biol. Chem.* 145, 379-386 (1942).
- Koepsell, H.J. und J.S. Meek. Role of phosphate in pyruvic acid dissimilation by cell free extracts of *Clostridium butylicum*. *J. Biol. Chem.* 154, 535-547 (1944).
50. Wilson, J., L.O. Krampitz und C.H. Werkman. Reversibility of a phosphoroclastic reaction. *Biochem. J.* 42, 598-600 (1948).
51. Utter, M.F., F. Lipman und C.H. Werkman. Reversibility of the phosphoroclastic split of pyruvate. *J. Biol. Chem.* 158, 521-528 (1945).
52. Mortlock, R.P., R.C. Valentine und R.S. Wolfe. Carbon dioxide activation in the pyruvate clastic system of *Clostridium butyricum*. *J. Biol. Chem.* 234, 1653-1656 (1959).
53. Mortlock, R.P. und R.S. Wolfe. Reversal of pyruvate oxidation in *Clostridium butyricum*. *J. Biol. Chem.* 234, 1657-1659 (1959).

54. Strecker, H.J. Formate fixation in pyruvate by E.coli.
J. Biol. Chem. 189, 815-830 (1951).
55. Wolfe, R.S. und D.J.O'Kane. Cofactors of the phosphoroclastic reaction of Clostridium butyricum. J.Biol.Chem. 205, 755-765 (1953).
- Wolfe, R.S. und D.J.O'Kane. Cofactors of carbon dioxide exchange reaction of Clostridium butyricum. J.Biol.Chem. 215, 637-643 (1955).
56. Valentine, R.C., R.L.Jackson und R.S.Wolfe. Role of ferredoxin in hydrogen metabolism of Micrococcus lactilyticus.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 7, 453-456 (1962a).
57. Valentine, R.C., W.J.Brill und R.S.Wolfe. Role of Ferredoxin in pyridine nucleotide reduction. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 48, 1856-1860 (1962b).
- Valentine, R.C. und R.S.Wolfe. Role of ferredoxin in the metabolism of molecular hydrogen. J.Bacteriol. 85, 1114-1120 (1963).
58. Cantino, E.C. und E.A.Horenstein. The stimulatory effect of light upon growth and CO₂ fixation in Blastocyladiella. I. The S.K.I. cycle. Mycologia, Vol. XLVIII, Nr.6 (1956).
59. Goldberg, M. und D.R.Sanadi. Incorporation of labeled carbon dioxide into pyruvate and α -ketoglutarat. J.Am.Chem.Soc. 74, 4972-4973 (1952).
60. Nutting, L.A. und S.F.Carson. Lactic acid fermentation of xylose by Escherichia coli. J.Bacteriol. 63, 575-580/581-589 (1952).
61. Gunsalus, I.C., B.H.Horecker und W.A.Wood. Pathways of carbohydrate metabolism in microorganisms. Bacteriol.Revs. 19, 79-128 (1955).
62. Cutinelli, C., G.Fhrensward, L.Reio, E.Saluste und R.Stjernholm.
Arkiv Kemi 3, 315 (1951). Zitat aus "The Bacteria" (10).
63. Wieringa, K.T. Antonie van Leeuwenhoek. J.Microbiol.Serol. 3, 263
Zitat aus "The Bacteria". (10). (1936).
64. Karlsson, J.L., B.E.Volcani und H.A.Barker. The nutritional requirements of Clostridium aceticum. J.Bacteriol. 56, 781-782 (1948).
65. Barker, H.A., S.Ruben und J.V.Beck. Proc.Natl.Sci.U.S. 26, 477 (1940).
66. Barker, H.A. und S.R.Elsden. J.Biol.Chem. 167, 619 (1947).

67. Fontaine, F.E., Peterson, W.E., M.J. Johnson und G.J. Ritter.
A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermo-*
aceticum. *J. Bacteriol.* 43, 701-715 (1942).
68. Barker, H.A. und M.D. Kamen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 31, 219 (1945).
69. Barker, H.A., Kamen, M.D. und V. Haas. Carbon dioxide utilization
in the synthesis of acetic and butyric acids by *Butyri-*
bacterium rettgeri. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 31, 355-360
(1945).
70. Cardon, B.P. und H.A. Barker. *Archiv Biochem.* 12, 165 (1947).
71. Barker, H.A., B.E. Volcani und B.P. Cardon. *J. Biol. Chem.* 173, 803
(1948).
72. Hayaishi, O., H. Shimazono, M. Katagiri und Y. Saito. *J. Am. Chem. Soc.*
78, 5126 (1956).
73. Quayle, J.R. und D.B. Keech. Carbon assimilation by *Pseudomonas oxa-*
laticus. Oxalate utilization during growth on oxalate.
Biochim. biophys. Acta 29, 223-230 (1958)
74. Lentz, K.E., Ph.D. Thesis. Western Reserve University, Cleveland,
Ohio (1956). Zitat aus "The Bacteria" (10).
75. Pine, L. und H.A. Barker. Tracer experiments on the mechanism of
acetate formation from carbon dioxide by *Butyribacterium*
rettgeri. *J. Bacteriol.* 68, 216-226 (1954).
76. Cramer, F. *Papierchromatographie*. Verlag Chemie G.m.b.H. 1958
Weinheim / Bergstr.
77. Lynch, V.H. und M. Calvin. Carbon dioxide fixation by microorganism.
J. Bacteriol. 63, 525-531 (1952).
78. Calvin, M. und Bassham, J.A. The path of carbon in photosynthesis.
1957. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J.
79. De Man, J.C., Rogosa, M. und M.E. Sharpe. A medium for the cultivation
of *Lactobacilli*. *J. appl. Bact.* 23, 1 : 130-135 (1960).
80. Neish, A.C. *Analytic Methods for Bacterial Foundations*. 1961.
National Research Council of Canada. Report No 46-8-3.
Saskatoon.
81. Wiesenberger, E. *Mikrochemie* 33, 51 (1948).
82. Kirchmeier, O. Eine Methode zur papierchromatographischen Qualitäts=
beurteilung von Silagen. *Zeitschr. f. Tierphysiol., und*
Futtermittelkunde 18, 111-114 (1963).

83. Benson, A.A., Bassham, J.A., M. Calvin, T.C. Goodale, V.A. Haas und W. Stepka. The path of carbon in photosynthesis. V. Paper chromatography and radioautography of the products. J. Am. Chem. Soc. 72, 1710-1718 (1950).
84. Randerrath, K. Ein einfaches Herstellungsverfahren für Cellulose-Anionenaustauscher und Anionenaustauscherpapier. Angew. Chem. 74, 780 (1962).
85. Mazur, R.H., B.W. Ellis und P.S. Camarata. A new reagent for detection of peptides, nucleotides and other N-H-containing compounds on paper chromatograms. J. Biol. Chem. 237, 1619-1621 (1962).
86. Heppel, L.A. und R.J. Hilme. Purification and properties of 5'-nucleotidase. J. Biol. Chem. 188, 665-676 (1951).
87. Heinrich, M.R. und D.W. Wilson. The biosynthesis of nucleic acid components studied with C^{14} . J. Biol. Chem. 186, 447-460 (1950).
88. Van Slyke, D.D., J. Plazin und J.R. Weisiger. Reagents for the van Slyke-Folch wet carbon combustion. J. Biol. Chem. 191, 299-304 (1951).
89. Prescott, J.M. und A.L. Stutts. Effects of carbon dioxide on the growth and amino acid metabolism of *Streptococcus bovis*. J. Bacteriol. 70, 285-288 (1955).
90. Lardy, H.A., R.L. Potter und R.H. Burris. J. Biol. Chem. 179, 721 (1949).
91. Shive, W. und L.L. Rogers. J. Biol. Chem. 179, 721 (1949).
92. McDonald, J.C. Synthesis of aspartic acid by *Lactobacillus arabinosus*. Can. J. Microbiology 4, 335-343 (1958).
93. Gibbs, M., R. Dumrose, F.A. Bennett und M.R. Bubeck. On the mechanism of bacterial fermentation of glucose to lactic acid studied with C^{14} -glucose. J. Biol. Chem. 184, 5845-5849 (1950).
94. Weinfurtner, F. Zur Physiologie der bierverderbenden Bakterien. Brauwelt, Jg. 97 Nr. 99/100 2011-2017 (1957).
95. McManus, R. A study of carbon dioxide fixation by *Micrococcus lysodeikticus*. J. Biol. Chem. 188, 729-739 (1951).
96. Prince, H.N. und R.C. Cleverdon. The Flavobacteria. III. Intermediate Metabolism of *Flavobacterium aquatile*. J. Bact. 70, 663-666 (1955).

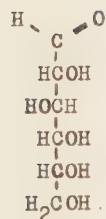
97. Barret J.T. und R.E.Kallio. Terminal respiration in *Pseudomonas fluorescenz*: Component enzymes of the tricarboxylic acid cycle. *J.Bacteriol.* 66, 517-525 (1953).
98. Kornberg,H.L. und H.A.Krebs. Synthesis of cell constituents from C_2 -units by a modified tricarboxylic acid cycle. *Nature (London)* 179, 988 (1957).
99. Wong, T.O.D. und S.J.Ajl. *Science* 126, 1013 (1957).
100. Campbell,J.J.R., R.A.Smith, B.A.Eagles. *Biochim.Biophys.Acta* 11, 594 (1953).
101. Smith,R.A. und I.C.Gunsalus. *J.Am.Chem.Soc.* 76, 5002 (1954).
102. Wong,D.T.O. und S.J.Ajl. *J.Am.Chem.Soc.* 78, 3230 (1956).
103. Kornberg,H.L. und N.B.Maasen. *Biochim.et Biophys.Acta* 24, 651 (1957).
104. Michelson,A.M. The chemistry of nucleosides and nucleotides. 1963. Academic Press London and New York.
105. Butterworth,E.M., C.M.Gilmour und C.H.Wang. Studies on the biochemistry of the *Streptomyces*. II. Fixation of CO_2 by intact cells of *Streptomyces griseus*. *J.Bacteriol.* 69, 719-724 (1955).
- Gilmour,C.M., E.M.Butterworth, E.Noble und C.H.Wang. Studies on the biochemistry of the *Streptomyces*. I. Terminal oxidative metabolism in *Str.griseus*.*J.Bacteriol.* 69, 719-724 (1955).
106. Delwiche,E.A. und S.F.Carson. A citric acid cycle in *Propionibacterium pentosaceum*. *J.Bacteriol.* 65, 318-321 (1953)
107. Delwiche,E.A. Mechanism of propionic acid formation by *Propionibacterium pentosaceum*. *J.Bacteriol.* 56, 811-820 (1948).
108. Gilvarg,C. und B.D.Davis. Significance of the tricarboxylic acid cycle in *E.coli*. *Fed.Proc.* 13, 217 (1954).
109. M'Lean,D.J. und E.F.Purdie. Effect of amino acids, purines, and pyrimidines on carbon dioxide fixation by *Serratia marcescenz*. *J.Biol.Chem.* 197, 539-545 (1962).
- M'Lean,D.J. und E.F.Purdie. Effect of dicarboxylic acids, amino acids, amides and carbohydrates on carbon dioxide fixation by *Serratia marcescenz*. *J.Bacteriol.* 69, 204-209 (1955).

110. Green, J.A. und R.L. Williams. Evidence for a tricarboxylic acid cycle in *Serratia marcescens*. J.Bacteriol. 78, 336-342 (1959).
111. Abelson, P.H., E.T. Bolton und Aldous, E. Utilization of carbon dioxide in the synthesis of proteins by *Escherichia coli*. J.Biol.Chem. 198, 165-178 (1952 a,b).
112. Bolton, E.T., P.H. Abelson und E. Aldous. Utilization of carbon dioxide in the synthesis of nucleic acid by *E. coli*. J.Biol.Chem. 198, 179 (1952).
113. Martin, J.K. und R.D. Batt. Oxydation of propionic acid by *Nocardia corallina*. J.Bacteriol. 74, 359-364 (1957).
114. Holzer, H., M.B. Bill und C. Cennamo. Zur Biochemie der Threonin-Desaminase aus Hefe. Angew.Chem. 75, 894-900 (1963).
115. Stoppani, A.O.M., Conches, L., De Favelukes, L.S. und F.L. Sacerdote. Assimilation of carbon dioxide by yeasts. Biochem.J. 70, 438-455 (1958).
116. Woronick, C.L. und M.J. Johnson. Carbon dioxide fixation by cell-free extracts of *Aspergillus niger*. J.Biol.Chem. 235, 9-15 (1960).
117. Ramakrishnan, C.V. Enzymologia 17, 169 (1954).

Die vorgelegte Arbeit wurde im Bakteriologischen Institut der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft der Technischen Hochschule München in Weihenstephan angefertigt. Herr Professor Dr. O. Kandler vom Institut für Angewandte Botanik der Technischen Hochschule München überließ mir freundlicherweise das Thema und förderte den Fortgang der Arbeit außerordentlich durch seine ständige rege Anteilnahme und durch viele wertvolle Hinweise. Dafür möchte ich ihm an dieser Stelle herzlichst danken. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft gebührt Dank für persönliche und sachliche finanzielle Unterstützung. Ferner möchte ich es nicht versäumen, Herrn Professor Dr. Kirchgeßner, Direktor des Instituts für Tierernährung der Technischen Hochschule München in Weihenstephan, für die Hilfe zu danken, die er mir zuteil werden ließ.

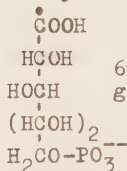
Lebenslauf.

Am 13.8.1932 wurde ich, Klaus-Wilhelm Grabbe, als Sohn des Gewerbeoberlehrers August Grabbe und seiner Ehefrau Erika, Maria, Doris, geb. Paulsen, in Artern, Kreis Sangerhausen/Thüringen, geboren. Im August 1939 übersiedelten meine Eltern nach Clausthal-Zellerfeld im Oberharz, wo ich von 1940 bis 1944 die Volksschule und anschließend die Robert-Koch-Oberrealschule besuchte. Nach Kriegsende wohnten wir im Elternhaus meines Vaters in Fuhlen bei Hameln/Weser. Meine Schulausbildung setzte ich von 1947 bis zum Abitur im März 1952 an der Oberrealschule in Hameln fort. Aus finanziellen Gründen arbeitete ich ein Jahr in einer Nahrungsmittelfabrik. Dann erlernte ich am Landesforschungsinstitut für Bienenzucht in Celle den Beruf eines Imkers. Meine Gehilfenprüfung legte ich im Frühjahr 1954 vor der Landwirtschaftskammer Hannover ab. Im Sommersemester des gleichen Jahres begann ich an der Universität Göttingen das Biologiestudium, das ich im Laufe der Jahre um die Fachrichtungen Mikrobiologie, Chemie und Biochemie erweiterte. An der Universität München ließ ich mich im Sommersemester 1957 immatrikulieren. Seit Juli 1960 fertigte ich im Bakteriologischen Institut Weihenstephan unter der Leitung von Herrn Professor Dr. O. Kandler die hier vorliegende Dissertation an. Während dieser Zeit hatte ich eine Stelle als wissenschaftliche Hilfskraft inne.

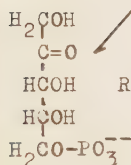


Glucose

Glucose-6-Phosphat



6-Phospho-
gluconsäure



Ribose-5-Phosphat

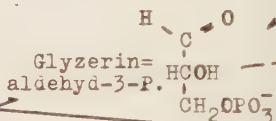
Ribulose-5-Phosphat

Xylulose-5-Phosphat

Hexosemonophosphat-Shunt

Fructose-6-Phosphat

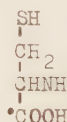
Fructose-1.6-Diphosphat



Entner-
Doudoroff-
Abbau

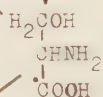
3-Phospho-
hydroxybrenztra-
bensäure

Cystein



Äthanol
 $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{OH}$

Serin



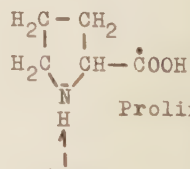
$\text{H}_3\text{C-COOH}$
Essigsäure

Glykokoll

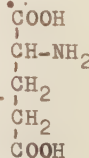


OH
 HCH-COOH
Glykolsäure

Prolin

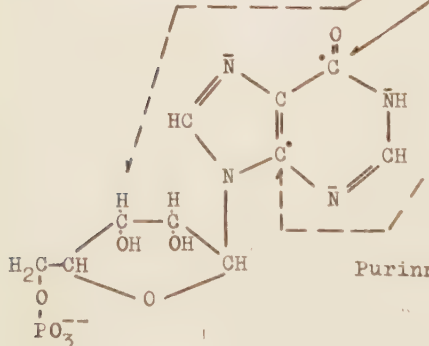


Ornithin



Glutaminsäure

Purinnucleotide



[illegible]

